

Série A, n° 3324

N° D'ORDRE : 4196

THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

PIERRE RICAUD

1^{re} THÈSE. — La prolineoxydase. Étude *in vitro* du métabolisme hépatique de la L(-)proline chez le rat.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 5 juillet 1958 devant la Commission d'examen

MM. PASCAL *Président.*

WURMSER . . }
M^{lle} LE BRETON . } *Examineurs.*

PARIS

IMPRIMERIE NATIONALE

1959

THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

PIERRE RICAUD

1^{re} THÈSE. — La prolineoxydase. Étude *in vitro* du métabolisme
hépatique de la L(-)proline chez le rat.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 5 juillet 1958 devant la Commission d'examen

MM. PASCAL *Président.*

WURMSER . . }
M^{lle} LE BRETON . } *Examineurs.*



PARIS

IMPRIMERIE NATIONALE

1959



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... J. PÈRES.

G. JULIA.....	T	Analyse supérieure et algèbre supérieure.	DANJON.....	T	Astronomie.
FOCH.....	T	Mécanique physique et expérimentale.	LAPORTE.....	T	Physique générale et radioactivité.
PAUTHENIER.....	T	Électrotechnique générale.	JANET.....	T	Mécanique analytique et mécanique céleste.
DE BROGLIE.....	T	Théories physiques.	PETIT.....	T	Biologie maritime.
PRENANT.....	T	Anatomie et histologie comparées.	QUENEY.....	T	Météorologie et dynamique atmosphér.
GARNIER.....	T	Géométrie supérieure.	GALLIEN.....	T	Embryologie.
PÈRES.....	T	Mécanique des fluides et applications.	EICHHORN.....	T	Biologie végétale.
LAUGIER.....	T	Physiologie générale.	DE CUGNAC.....		Biologie végétale (S. P.C.N.).
M. CURIE.....	T	Physique (S.P.C.N.).	CAUCHOIS (M ^{lle}).....	T	Chimie physique.
BARRABÉ.....	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	THELLIER.....	T	Physique du globe.
G. DARMOIS.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	L'HÉRITIER.....	T	Génétique.
J. BOURCART.....	T	Géographie physique et géologie dynamique.	GRIVET.....	T	Radioélectricité.
PLANTEFOL.....	T	Botanique.	PONCIN.....	T	Mécanique générale.
GRASSÉ.....	T	Évolution des êtres organisés.	DUBREIL.....	T	Arithmétique et théorie des nombres.
PREVOST.....	T	Chimie organique.	QUELET.....	T	Chimie organique.
BOULIGAND.....	T	Application de l'analyse à la géométrie.	CAGNIARD.....	T	Géophysique appliq.
CHAUDRON.....	T	Chimie appliquée.	CHAMPETIER.....	T	Chimie macromoléculaire.
WYART.....	T	Minéralogie.	CUVILLIER.....	T	Géologie structurale et géologie appliquée.
TEISSIER.....	T	Zoologie.	JUNG.....	T	Pétrographie.
MANGENOT.....	T	Biologie végétale.	TRILLAT.....	T	Microscopie et diffraction électronique.
P. AUGER.....	T	Physique quantique et relativité.	WIEMANN.....	T	Chimie organique et structurale.
MONNIER.....	T	Physiologie générale.	JACQUINOT.....	T	Spectroscopie et physique céleste.
PIVETEAU.....	T	Paléontologie.	VASSY.....	T	Physique de l'atmosphère.
ROCARD.....	T	Physique (E.N.S.).	DESTOUCHES.....		Théories physiques.
H. CARTAN.....	T	Mathématiques (E.N.S.).	M. PRUVOST.....	T	Géologie.
LAFFITTE.....	T	Chimie générale.	AMIEL.....	T	Chimie générale (P.C.B.).
FAVARD.....	T	Géométrie supérieure.	HOCART.....	T	Minéralogie.
COULOMB.....	T	Physique du globe.	J.-P. MATHIEU.....	T	Physique (P.C.B.).
COUSIN (M ^{lle}).....	T	Biologie animale (S.P.C.N.).	COUTEAUX.....	T	Biol. animale (P.C.B.).
CHRÉTIEN.....	T	Chimie minérale.	MAY.....	T	Biol. animale (P.C.B.).
P. DRACH.....	T	Zoologie.	CHOQUET.....	T	Calcul différentiel et intégral.
KASTLER.....	T	Physique (E.N.S.).	FELDMANN.....	T	Biologie (P.C.B.).
EPHRUSSI.....	T	Génétique.	GUINIER.....	T	Physique des solides.
WURMSER.....	T	Biologie physico-chim.	JOST.....	T	Physiologie comparée.
RIVIÈRE.....	T	Géologie (S.P.C.N.).	FORTET.....	T	Calcul des probabilités.
GAUTHERET.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).	SCHWARTZ.....	T	Calcul différentiel et intégral.
LUCAS.....	T	Recherches physiques.	CHOUARD.....	T	Physiologie végétale.
A. THOMAS.....	T	Biologie cellulaire.	MALAVARD.....	T	Aviation.
ARNULF.....	T	Optique appliquée.	BRELOT.....	T	Calcul différentiel.
M. MORAND.....	T	Enseignement de physique.	NORMANT.....	T	Chimie organique (P.C.B.).
SOLEILLET.....	T	Physique.	BENARD.....	T	Chimie (P.C.B.).
FORTIER.....	T	Mécanique expérimentale des fluides.	BUVAT.....	T	Botanique (E.N.S.).
			DUGUÉ.....	T	Statistiques mathém.
			GELOSO.....	T	Chimie (S.P.C.N.).

SOULAIRAC.....	T	Psychophysiologie.	BRUN.....	Mécanique expérimentale des fluides.
ULRICH.....	T	Physiologie végétale.	LEDERER.....	T Chimie biologique.
MARÉCHAL.....	T	Optique théorique et appliquée.	DUBREIL (M ^{me}).....	T Mathématiques.
KIRRMANN.....	T	Théories chimiques.	LELONG (M ^{me}).....	T Mathématiques (E. N. S.).
CHADEFAUD.....		Botanique.	BELLAIR.....	T Géologie (S.P.C.N.).
DESTRIAU.....	T	Physique (M.P.C.).	COTTE.....	T Physique (M.P.C.).
LE BRETON (M ^{lle})....	T	Physiologie générale.	J.-E. DUBOIS.....	T Chimie (S.P.C.N.).
SALEM.....	T	Mathématiques générales.	LAMOTTE.....	Zoologie (E. N. S.).
LELONG.....	T	Mathématiques générales.	André MICHEL.....	T Chimie (S.P.C.N.).
DEVILLERS.....		Anatomie et histologie comparées.	OLMER.....	T Énergétique générale.
EHRESMANN.....	T	Topologie algébrique.	ROUAULT.....	T Physique générale.
FRANÇON.....		Physique (S.P.C.N.).	GAUTHIER.....	T Mécanique appliquée.
GLANGEAUD.....	T	Géographie physique et géologie dynam.	BARCHEWITZ.....	Chimie physique.
GODEMENT.....	T	Mathématiques (M.P.C.).	BROSSEL.....	Physique atomique.
PISOT.....	T	Calcul des probabilités	BUSER.....	Biologie animale (P.C.B.).
E. ROCH.....	T	Géologie.	CAMUS.....	Biologie végétale (P.C.B.).
SCHATZMANN.....		Astrophysique.	CASTAING.....	Physique générale.
TERMIER.....	T	Paléontologie stratigraphique.	CURIEN.....	Minéralogie et cristallographie.
ZAMANSKY.....	T	Mathématiques générales.	MOYSE.....	Physiologie végétale.
JOLIOT.....	T	Physique nucléaire et Radioactivité.	NOIROT.....	Évolution des êtres organisés.
LENNUIER.....		Physique (P.C.B.).	PANNETIER.....	Chimie (P.C.B.).
RIZET.....		Génétique.	POSSOMPES.....	Biologie animale (P.C.B.).
ROUTHIER.....		Géologie appliquée.	PULLMANN.....	Chimie théorique.
TONNELAT (M ^{me})....		Théories physiques.	TEILLAC.....	Physique nucléaire et radioactivité.
DIXMIER.....		Mathématiques (M.P.C.).	TONNELAT.....	Biologie physico-chim.
SOUCHAY.....		Chimie générale.	VILLE.....	Économétrie.
AIGRAIN.....		Physique (P.C.B.).	WILLEMART.....	Chimie (P.C.B.).
BRUSSET.....		Chimie minérale.	DODÉ.....	Chimie.
M. LÉVY.....		Physique théorique.	FREYMANN.....	Physique (S.P.C.N.).
LENORMANT.....		Physiologie.	GUINOCHE.....	Biologie végétale (Orsay).
CHAIX (M ^{me}).....		Chimie biologique.	ROLLET.....	Chimie (P.C.B.).
HUREL-PY (M ^{me})....		Biologie végétale (P.C.B.).	JOSIEN (M ^{lle}).....	Chimie (P.C.B.).
PIAUX.....		Chimie (P.C.B.).	CHEVALLEY.....	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
			DESNUELLE.....	T Chimie biologique.

Secrétaire général..... C. MONIER.

A Monsieur le Professeur Jean ROCHE,

Mon Maître

A ma famille

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont été réalisées au Laboratoire de Biochimie générale et comparée du Collège de France sous la direction de M. le Professeur Jean ROCHE. Qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma reconnaissance pour l'accueil si bienveillant qu'il m'a réservé dans son laboratoire et pour le soin qu'il a pris de mon éducation de biochimiste.

Qu'il me soit permis aussi de remercier :

— M. NGUYEN-VAN THOAI, directeur à l'École pratique des Hautes Études, pour tous les conseils qu'il m'a prodigués au cours de ce travail;

— M. le Professeur PASCAL, membre de l'Institut;

— M. le Professeur WURMSER;

— M^{lle} LE BRETON,

de l'accueil qu'ils m'ont réservé et de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier M. l'Ingénieur général FLEURY, directeur du Service des Poudres pour l'orientation qu'il a bien voulu donner à ma formation et pour tous ses encouragements au cours de ce travail; M. l'Ingénieur général FAUVEAU, alors directeur du Laboratoire central des Poudres, pour toutes les facilités qu'il m'a accordées et les moyens matériels qu'il a mis à ma disposition; M. l'Ingénieur général CORBU qui, en tant que directeur du Centre d'études du Bouchet, m'a permis de concilier mes fonctions avec mes travaux de laboratoire auxquels il a bien voulu s'intéresser; M. l'Ingénieur en chef TERNIER qui, en lui succédant, m'a accordé les mêmes facilités pour l'achèvement de ce travail.

Ma gratitude s'adresse aussi à tous ceux qui m'ont aidé au cours de ces recherches :

M. CHEDIN, directeur du Laboratoire central des Services chimiques de l'État, où ont pu être réalisées certaines observations au microscope électronique;

M. ROBBA, M^{me} DUBORD, M^{lle} DESVAGES, tous mes collègues du Collège de France, du Laboratoire central des Poudres et du Centre d'études du Bouchet.

LA PROLINEOXYDASE

ÉTUDE IN VITRO DU MÉTABOLISME HÉPATIQUE DE LA L(—)PROLINE CHEZ LE RAT

INTRODUCTION

Synthétisée en 1900 par WILLSTATTER (140), la L-proline était isolée l'année suivante de la caséine par FISCHER (31). Elle devait par la suite être retrouvée en proportions variables dans de nombreuses protéines de mammifères [hémoglobine, albumine, γ -globuline, etc.] (128) en particulier dans les hormones peptidiques comme la vasopressine (2), l'ocytocine (129), ou protéiques telles que l'insuline (110) l'hormone β -corticotrope, et dans des toxines protéiques comme la toxine botulique (19).

En raison de la présence très générale de la proline dans les peptides et protéines, et des perturbations que la planéité du noyau pyrrolique de cette molécule introduisait dans la représentation hélicoïdale des protéines, de nombreuses études ont été consacrées à l'influence de la proline sur la structure protéique (76).

Mais dans les protéines des organes, la proline se renouvelle à une vitesse particulièrement élevée, à partir de l'imino-acide introduit dans le régime (122). Ceci implique un métabolisme important de la proline, mais bien avant que STETTEN et SCHOENHEIMER en apportent la preuve *in vivo*, on avait montré que la proline augmentait, *in vitro*, la consommation d'oxygène de coupes de rein [BERNHEIM (12)] de foie [KREBS (58)] et de cœur [BASU et BASAK (8)].

Analysant l'oxydation de la proline, WEIL MALHERBE et KREBS (139) notaient la formation d'azote aminé : isolant l'acide α céto-glutarique du milieu d'incubation après addition d'arsénite, ils en déduisaient que cet azote aminé se trouvait sous forme d'acide glutamique. NEBER (86) isolant l'acide glutamique lui-même, confirmait cette hypothèse.

L'examen des modes et des intermédiaires de la transformation de la proline en acides glutamique et α céto-glutarique allait fournir un certain intérêt spéculatif à l'étude du métabolisme de cet acide iminé, dont l'importance paraissait secondaire depuis qu'ABDERHALDEN avait montré son caractère non essentiel dans le régime (1). Trente ans plus tard ALMQUIST pouvait cependant noter un rôle bénéfique spécifique de la proline sur la croissance du poussin (4) au moment où d'autres auteurs lui trouvaient dans certaines conditions un effet inhibiteur sur la croissance du jeune rat (48).

De nombreuses hypothèses, relatives au mécanisme d'oxydation de la proline devaient s'affronter : KREBS (59) pensait que la L(—)proline pouvait, comme son isomère D(+), s'oxyder en acide α cété δ -amino valérique, hypothèse que devaient appuyer BLANCHARD (16) et STUMPF (125). D'après ces différents auteurs cet acide s'oxydait en acide α -céto-glutarique, l'acide glutamique en dérivait par transamination, à partir du pool métabolique de l'organisme. Mais STETTEN et SCHOENHEIMER (122) tout en montrant l'importance du métabolisme de la proline devaient infirmer cette hypothèse par des expériences dans lesquelles du Deutérium et de l'Azote 15 marquant la proline ingérée se retrouvaient l'un et l'autre dans la molécule d'acide glutamique. Ils suggérèrent, et SHEMIN et RITTENBERG devaient reprendre cette hypothèse (114), comme premier stade de l'oxydation de la L-proline la formation du γ -semi-aldéhyde glutamique. TAGGART et KRAKAUR (126) considérèrent cet aldéhyde, ou sa forme cyclique, l'acide pyrroline-carboxylique comme un produit intermédiaire de l'oxydation complète de la proline par la cyclophorase de rein de lapin. Ils pensèrent même avoir isolé la 2,4-dinitro-phényl-hydrazone du semi-aldéhyde glutamique mais des doutes ont été émis par VOGEL (134) sur la nature exacte du composé obtenu.

Cet auteur a pu préciser les relations entre la proline et l'acide glutamique dans le métabolisme de certains micro-organismes. Il a démontré sans ambiguïté (133) l'existence, dans la synthèse par *Escherichia coli* de la proline à partir d'acide glutamique, des intermédiaires semi-aldéhyde γ -glutamique et acide Δ_1 -pyrroline-5-carboxylique. Les possibilités offertes par les micro-organismes, bactéries ou champignons, pour les études de ce genre : cultures sur milieux synthétiques bien définis, existence de mutants à l'assortiment enzymatique varié, ont permis de préciser les connections métaboliques entre le glutamate, la proline et l'ornithine. *Escherichia coli*, *Neurospora crassa* et *Torulopsis utilis* présentent la même séquence dans la synthèse de la proline à partir de l'acide glutamique (135). L'existence parmi les souches de *E. coli* de mutants n'effectuant que certaines étapes de la synthèse, a permis l'accumulation des composés intermédiaires mentionnés ci-dessus (133).

Le mutant exigeant la présence de proline pour sa croissance excréta le semi-aldéhyde dans le milieu de culture à la différence du mutant correspondant de *N. crassa*. Ces différences se retrouvent également dans les relations entre la proline et l'ornithine : les voies de synthèse de la proline et de l'ornithine à partir de l'aldéhyde semi-glutamique seraient physiquement séparées dans les champignons et non dans les bactéries comme *E. coli*, une telle séparation pouvant être due à une organisation spatiale des systèmes enzymatiques (136).

Les cellules de mammifères présentent une organisation analogue (41), les enzymes responsables de la dégradation et de la synthèse de la proline pouvant se retrouver juxtaposés dans les mêmes cellules : SMITH et GREENBERG ont récemment trouvé dans le liquide cytoplasmique des cellules hépatiques du rat, débarrassé de corpuscules par ultra-centrifugation, une réductase du semi-aldéhyde glutamique le transformant en proline (120).

Les travaux de LANG (64), de TAGGART, suggéraient que l'oxydation de la proline était liée au contraire aux structures cellulaires.

Les résultats de cette oxydation, non plus limitée au métabolisme intermédiaire, mais envisagée dans le cadre du métabolisme de l'organisme entier des mammifères ont donné également lieu à de multiples travaux, montrant en particulier

le rôle de la proline dans la glycogénèse (47) et l'uréogénèse (96) où elle se comporte sensiblement comme l'acide glutamique. On connaît le rôle des transaminations au niveau hépatique dans cette élaboration de l'urée, et l'on peut concevoir des étapes et des degrés différents dans l'oxydation de la proline par des préparations de foie et de rein. Ainsi cette oxydation est sous la dépendance de la cortisone dans le rein et non dans le foie (121, 132).

Aussi nous a-t-il semblé intéressant d'examiner le point auquel aboutissait l'oxydation de la proline au niveau des structures cellulaires de foie dans différentes conditions, le mécanisme de ces transformations et leur répercussion énergétique sur la vie de la cellule.



PREMIÈRE PARTIE

LOCALISATION ET CONDITIONS
D'ACTIVITÉ OPTIMUM
DE LA PROLINEOXYDASE HÉPATIQUE

CHAPITRE I^{er}

ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE L'ACTIVITÉ DES HOMOGÉNATS LAVÉS
DE FOIE DE RAT

Depuis longtemps l'oxydation de la L-proline *in vitro* avait été mise en évidence en présence de coupes de différents tissus (8, 12, 58) et l'on a cherché à obtenir une préparation enzymatique pure, mais l'activité s'est toujours trouvée attachée à une fraction cellulaire insoluble et il n'a jamais été possible d'isoler un enzyme responsable de cette oxydation [l'extrait acétonique de rein de porc qui, selon DAS (28), oxydait la proline, est en réalité la d-amino acide oxydase classique et n'agit que sur la D(+)-proline]. Par contre, l'oxydation de la L(—)proline a pu être réalisée par des homogénats de foie ou de rein, filtrés sur gaze pour retenir les gros débris cellulaires, et lavés plusieurs fois pour éliminer les substrats endogènes. L'homogénéisation était effectuée, soit en tampon phosphate par LANG et SCHMID (64) soit en solution de chlorure de potassium isotonique par TAGGART et KRAKAUR (126).

Ces auteurs furent à notre connaissance les premiers à suivre simultanément les consommations d'oxygène et de substrat de leurs préparations, concluant ainsi à une oxydation complète de la proline par la cyclophorase. Mais, bien que l'école de GREEN ait préparé la cyclophorase tant à partir de foie que de rein de lapin (42), il semble que les études systématiques du mécanisme de l'action prolineoxydase aient été effectuées essentiellement avec ce dernier tissu. L'activité des préparations utilisées paraît d'ailleurs inconstante, sans doute en raison de la méthode délicate de préparation de la cyclophorase, en particulier de la minutie avec laquelle devait être maintenu en cours d'opération le pH du milieu d'homogénéisation, et la consommation d'oxygène d'une expérience à l'autre variait du simple au double dans les expériences rapportées.

De plus, la détermination du substrat restant par le sulfonate de β -naphtoquinone (32) supposait, en raison de son caractère très général, que la proline était, en dehors de l'acide glutamique dont il était tenu compte, le seul acide aminé présent dans le milieu.

Aussi avons-nous entrepris l'étude de l'activité proline-oxydasique du foie de rat en cherchant à améliorer la technique de préparation de l'homogénat, dans le sens de l'augmentation de son pouvoir enzymatique, comme de la simplification du mode opératoire. En même temps nous avons suivi la disparition de la proline par une méthode plus spécifique que celle de FOLIN (32).

I. — PRÉPARATION DES HOMOGÉNATS

Des rats blancs mâles, pesant de 100 à 150 grammes sont décapités après un jeûne de 24 heures, destiné à éliminer le glycogène hépatique [CLAUDE (24)]. Les foies sont immédiatement recueillis dans la glace pour réduire l'autolyse du tissu, dégradant les structures cellulaires et subcellulaires, et inactivant les systèmes enzymatiques. Le tissu pesé, est grossièrement coupé aux ciseaux et broyé dans un homogénéiseur de POTTER-ELVEHJEM (98), en présence d'environ deux fois son poids d'une solution tampon isotonique glacée, de pH 7,8 (chlorure de potassium 0,13 M, phosphate de sodium 0,03 M) [cette solution, comme toutes les autres utilisées dans ces expériences, est préparée avec de l'eau bidistillée, pour éviter la présence d'ions métalliques inhibiteurs]. Ce broyage s'effectue en chambre froide, vers — 5 °C.

Parmi les moyens d'homogénéisation possibles, nous avons éliminé le broyage au mortier en l'absence de sable [CLAUDE (24)] en raison de son faible rendement dans la dilacération des cellules, ainsi que le broyage au Turmix [GREEN (42), TAGGART (126)], qui d'après POTTER (100) dégrade certes les structures cellulaires, mais aussi les structures subcellulaires, et libère des ions Mn^{++} inactivant certains enzymes. La destruction des noyaux peut être d'ailleurs une des causes de l'acidification du milieu constatée par TAGGART (126) au cours de l'homogénéisation au Waring-Blendor, acidification qu'aurait d'ailleurs pu réduire éventuellement la solution tampon utilisée pour l'homogénéisation à la place de la solution de chlorure de potassium.

L'homogénéiseur en verre que nous utilisons est légèrement modifié par rapport au type original de POTTER, pour réduire au cours des opérations l'échauffement et la formation de poudre de verre, susceptibles de léser les particules que l'on se propose de recueillir :

— le piston rodé est rempli d'alcool, et refroidi à — 10 °C avant l'expérience, pour absorber la chaleur dégagée par le frottement contre le cylindre rodé;

— on congèle au fond du cylindre quelques centimètres cubes de tampon d'homogénéisation, pour que le tissu soit broyé par les arêtes en verre à la base du piston, non plus contre une surface dure, mais contre de la glace.

On obtient ainsi un homogénat à 35 p. 100 environ (poids frais/volume) de pH 7,4, qui est dilué jusqu'à 20 p. 100 par la même solution tampon, filtré à travers deux épaisseurs de gaze pour retenir le tissu conjonctif dilacéré, les membranes cellulaires et les cellules intactes, puis centrifugé 7 minutes sous 3.000 gravités en chambre froide à 0 °C (centrifugeuse oblique SERVALL SS-1). Le liquide surnageant est éliminé, le culot remis en suspension et ramené au volume initial par réhomogénéisation dans l'appareil de POTTER, en présence de la solution tampon précédente. Cette suspension est centrifugée 5 minutes à une accélération de 3 000 gravités. Le culot est relavé et rassemblé une nouvelle fois de la même manière

avant d'être réhomogénéisé, toujours dans le même tampon, pour obtenir une suspension de tissu à 40 p. 100 (400 mg de tissu frais par cm³ de suspension).

La teneur en azote de l'homogénat ainsi lavé trois fois est relativement constante, comme le montre le tableau 1, compte tenu des pertes variables de tissu au cours des remises en suspension des culots et l'on retrouve 25 à 30 p. 100 de l'azote total du tissu après les trois lavages.

TABLEAU N° 1

Composition des différents homogénats

HOMOGENAT INITIAL à 20 ‰		HOMOGENAT LAVÉ 3 FOIS (40 ‰)		AZOTE récupéré ‰	REMARQUES
Poids sec + (mg/cm ³)	Azote total (Kjeldahl) (mg/cm ³)	Poids sec + (mg/cm ³)	Azote total (Kjeldahl) (mg/cm ³)		
"	"	31	3,6	"	+ Le poids sec du tampon (11 mg) a été déduit du poids sec de la suspension.
"	"	26	3,4	"	
"	"	31	3,5	"	
"	"	28	3,3	"	
"	"	26	3,0	"	
"	5,3	24	2,7	26	* Homogénat lavé 1 fois (20 ‰). ** Homogénat lavé 2 fois (20 ‰).
46	5,7	25	2,7	24	
"	"	"	2,5*	45*	
"	"	"	2,0**	35**	
"	5,1	27	3,2	30	

II. — MESURE DE L'ACTIVITÉ PROLINEOXYDASIQUE

L'oxydation enzymatique de la proline est suivie en mesurant manométriquement la consommation d'oxygène en fonction du temps par la méthode directe de WARBURG [UMBREIT (130)]. Pour comparer l'activité de nos préparations à celles d'autres auteurs, nous avons adopté le milieu réactionnel utilisé dans l'étude de l'activité prolineoxydasique de la cyclophorase (126) :

0,3 cm³ de tampon de phosphate de sodium 0,1 M ajusté à pH 7,4;
 0,2 cm³ de sulfate de magnésium 0,04 M (soit 8 μM par fiole);
 0,1 cm³ de chlorure de potassium 1,5 M (150 μM par fiole);
 0,3 cm³ d'acide adénosine-5'-phosphorique (AMP) à 20 mg/cm³, neutralisé par la soude (15 μM par fiole);
 0,3 cm³ de L(-)proline 0,1 M (soit 30 μM par fiole);
 Le volume est complété à 1,8 cm³ par de l'eau bidistillée.

On dispose dans le puits central de la fiole 0,2 cm³ de potasse à 10 p. 100 et un fragment de papier filtre pour augmenter la surface d'absorption du gaz carbonique. Les fioles sont refroidies dans la glace avant d'introduire 1 cm³ de suspen-

sion de tissu. Le milieu est oxygéné par passage d'un courant d'oxygène pendant 8 à 10 minutes, et les fioles mises à incuber dans un thermostat à 35 °C, 10 minutes avant le début des mesures, pour laisser la température du milieu réactionnel s'équilibrer avec celle du bain thermostatique.

On adopte comme temps 0 le moment où les fioles sont introduites dans le thermostat et l'on mesure la consommation d'oxygène toutes les cinq minutes, à partir du moment où fioles et bain sont en équilibre de température (environ 10 minutes). L'oxygène fixé pendant la période initiale d'égalisation des températures est déterminé par extrapolation graphique de la courbe de consommation. La valeur ainsi trouvée est certes assez aléatoire, mais :

1° Il est impossible d'équilibrer les températures en l'absence de substrat, suivant la technique usuelle, car les préparations, comme d'ailleurs la cyclophorase, perdent alors toute leur activité enzymatique.

2° Cette imprécision, que l'on peut évaluer au maximum à 30 p. 100 de la valeur calculée par extrapolation n'a pas de grandes répercussions : elle n'intervient pas dans la détermination de l'activité enzymatique, mesurée par la *vitesse maximum* de consommation d'oxygène, mais seulement dans le calcul de la consommation totale d'oxygène, servant à l'établissement des bilans de réaction. La valeur extrapolée étant toujours inférieure à 15 p. 100 de la consommation totale, l'erreur sur cette dernière n'atteint jamais 5 p. 100.

Quand la consommation d'oxygène a cessé, le contenu des fioles de Warburg est prélevé par siphonnage dans des tubes de centrifugeuse. Les fioles sont rincées deux fois par environ 2 cm³ d'eau distillée, et l'ensemble des liquides est déprotéinisé par 2 cm³ d'acide trichloracétique à 15 p. 100. Après un repos de quelques heures à la glacière, les tubes sont centrifugés, les culots lavés deux fois par 5 cm³ d'acide trichloracétique à 5 p. 100, et l'ensemble des trois surnageants amené à 25 cm³ par de l'eau distillée.

La proline restant en solution est alors dosée colorimétriquement par réaction avec la ninhydrine en milieu acide, suivant la technique de CHINARD (22) :

Dans un tube jaugé à 5 cm³, on ajoute :

à 1 cm³ de solution diluée de manière à contenir moins de 0,15 μ M de Proline,
1 cm³ d'une solution de ninhydrine à 2,5 p. 100 dans un mélange d'acide phosphorique 6 M (40 p. 100) et d'acide acétique glacial (60 p. 100);
1 cm³ d'acide acétique glacial.

Les tubes soigneusement agités, sont couverts par un capuchon de verre et portés 1 heure au bain-marie bouillant. On rince ensuite les capuchons et le bord des tubes par 1 cm³ d'acide acétique glacial, et, après retour à la température ambiante, on complète à 5 cm³ par de l'acide acétique glacial. On mesure la densité optique de la solution au spectrophotomètre Beckman, contre de l'acide acétique glacial, à 515 m μ .

En effet, le spectre du composé formé [le dicétohydryndylidène-pyrrole isolé pour la première fois par GRASSMANN et von ARNIM (39)] présente un maximum d'absorption entre 512 et 516 m μ (fig. 1).

Dans ces conditions, la densité optique est proportionnelle à la concentration entre 0,02 et 0,15 μ M de proline (2,5 à 17 μ g). La solution trichloracétique provenant des fioles de Warburg est diluée pour obtenir si possible une concentration en proline voisine de 0,1 μ M/cm³.

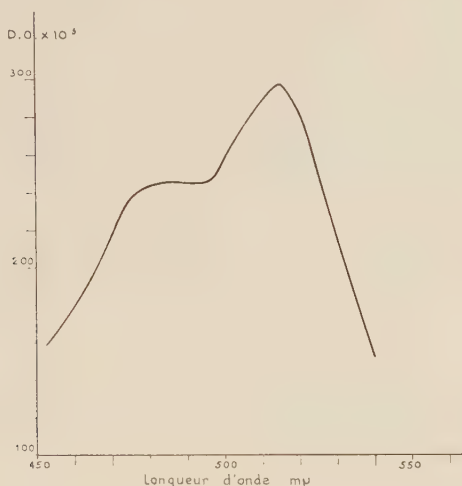


FIG. 1

Spectre d'absorption du produit de réaction de la proline avec la ninhydrine en milieu acide
Concentration de la solution de proline : $0,1 \mu\text{M}/\text{cm}^3$

Pour chaque série de dosages, on détermine la densité optique :

- 1° D'un produit de réaction d'une solution fraîche de proline ($0,1 \mu\text{M}/\text{cm}^3$);
- 2° De l'ensemble des réactifs sans proline (densité qui doit rester comprise entre 0,005 et 0,010);
- 3° De 1 cm^3 de solution trichloracétique provenant d'une fiole témoin (dans laquelle 1 cm^3 d'homogénat a été incubé dans les conditions même d'oxydation de la proline, mais en l'absence de ce substrat). Cette densité optique est comprise entre 0,030 et 0,060 suivant la durée d'incubation;
- 4° De 1 cm^3 de solution trichloracétique provenant d'un témoin initial sans proline identique au contenu de la fiole témoin définie ci-dessus, mais déprotéinisé à froid dès l'addition de l'homogénat (la densité optique sensiblement égale à celle des réactifs seuls permet de penser que les valeurs trouvées en 3°) après incubation des mêmes milieux proviennent des produits d'autolyse de l'homogénat;
- 5° De 1 cm^3 d'une dilution convenable de solution trichloracétique d'un mélange réactionnel renfermant de la proline identique au contenu des fioles en expérience, mais déprotéinisé à froid comme le témoin initial du 4° dès l'addition de l'homogénat;
- 6° D'une prise appropriée d'une dilution de la solution trichloracétique à doser.

La quantité de proline consommée est calculée par différence entre la quantité initialement introduite dans les fioles (en général 30 micromolécules) et la quantité restante. Cette dernière est déterminée d'après la densité optique du produit de la réaction (6°), corrigée de la coloration apportée par l'homogénat incubé (3°). Les mesures décrites en 1°, 2°, 4° et 5° sont effectuées à titre de contrôle.

Dans le cas général d'une consommation importante de proline, la plus grande partie de l'erreur provient du pipetage initial de $0,3 \text{ cm}^3$ de substrat : elle est de l'ordre de 1 p. 100. Dans les autres cas, s'y ajouteront les erreurs provenant des dilutions et prélèvements du milieu d'incubation en fin de réaction (de l'ordre de

1 p. 100) et de la détermination colorimétrique elle-même (de ± 1 p. 100 autour de $0,1 \mu\text{M}$ de proline).

Ce mode de dosage donne une marge d'erreur acceptable, de l'ordre de 3 p. 100 et son emploi est légitime du fait de sa spécificité : seules l'ornithine et à un degré moindre la citrulline donnent la même réaction que la proline avec la ninhydrine, et des concentrations 20 fois supérieures des autres acides aminés (à l'exclusion toutefois de la lysine) ne perturbent pas le dosage.

III. — RÉSULTATS DES MESURES D'ACTIVITÉ

a. CONSOMMATION D'OXYGÈNE

Les homogénats lavés de foie de rat, préparés comme il vient d'être indiqué, et utilisés dans les 2 ou 3 heures suivant la mort de l'animal manifestent une activité prolineoxydasique intense (fig. 2).

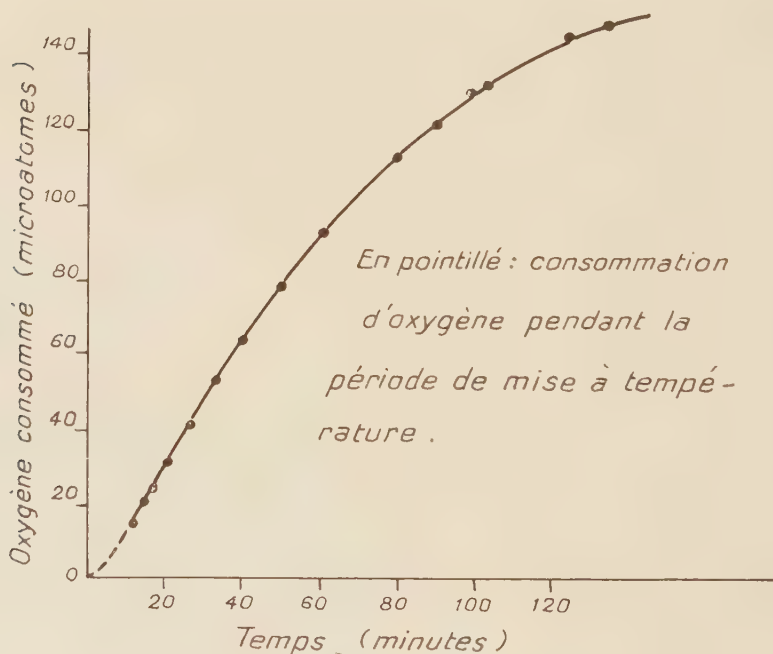


FIG. 2

Oxygène consommé en fonction du temps

Composition du milieu pour une fiole :

1 cm^3 d'homogénat lavé trois fois (azote Kjeldahl 3,0 mg).

Tampon phosphate de sodium pH 7, 4: $30 \mu\text{M}$; SO_4Mg : $8 \mu\text{M}$; KCl : $150 \mu\text{M}$; AMP : $15 \mu\text{M}$;

L (—) proline : $30 \mu\text{M}$.

Volume complété à $2,8 \text{ cm}^3$ par de l'eau bidistillée.

Alcali dans le puits central. Température 35°C .

Oxygénation douze minutes; mise en température dix minutes (la consommation d'oxygène pendant cette période est représentée en pointillé).

Influence des lavages

Les lavages, dont on a précédemment indiqué la répercussion sur la teneur en azote des préparations, en modifient également l'activité (fig. 3) :

— la respiration endogène des préparations est presque totalement supprimée à partir du deuxième lavage, par élimination des substrats intracellulaires;

— l'activité enzymatique, mesurée par la vitesse de consommation d'oxygène en présence de L-proline augmente légèrement après le premier lavage, sans doute par suite de l'élimination des protéines protoplasmiques inactives, ou même inhibitrices. Cette activité diminue au cours des lavages suivants, tandis que l'activité spécifique demeure sensiblement constante (tableau 2).

TABLEAU N° 2

Influence des lavages sur l'activité prolineoxydasique

FRACTION	TAUX D'AZOTE mg/cm ³	ACTIVITÉ TOTALE μAt. O/mn	ACTIVITÉ	RESPIRATION
			SPÉCIFIQUE	ENDOGENE
			μAt. O/mn. /mgN	
H.....	5,7*	1,04	0,2	0,04
I.....	2,5*	1,27	0,5	0,01
II.....	1,9*	0,64	0,4	0
III.....	2,7**	1,05	0,4	0

* Homogénat à 20 %.

** Homogénat à 40 %.

La disparition d'une partie de l'activité globale de l'homogénat de départ paraît due à une altération, au cours des remises en suspension, d'une partie des particules cellulaires actives, qui ne se sédimentent plus lors de la centrifugation suivante. Intervient également la diminution de concentration du tissu dans le milieu (dont nous étudierons l'influence au chapitre IV de cette première partie. Cette diminution ne joue plus après le troisième lavage car la préparation est alors une suspension à 40 p. 100 et non plus à 20 p. 100 comme précédemment). La réduction de l'activité globale au cours des lavages est partiellement compensée par une augmentation de stabilité de l'enzyme dans le milieu réactionnel, prolongeant la durée d'oxydation (fig. 3).

Activité des préparations lavées

Comme nous l'avons précédemment signalé (107), l'activité enzymatique de ces préparations est élevée. Elle se traduit par une valeur de Q_{O_2} et une durée d'activité comparables à celles de la cyclophorase étudiée par TAGGART (126) et une consommation de proline bien supérieure (tableau 3). Mais cette activité varie cependant sensiblement d'une préparation à l'autre. Plus qu'aux réactions individuelles des tissus animaux, ces variations (que présenteront également, mais à un degré moindre, les suspensions de mitochondries pures) sont dues à la labilité des préparations en l'absence de substrats. Le foie fournit d'ailleurs, a indiqué GREEN (40), des préparations beaucoup moins stables que les homogénats de rein

ou de cœur, utilisés par d'autres auteurs. Même à 0 °C, l'activité en l'absence de substrats ne se conserve pas plus de quelques heures et elle disparaît totalement en quelques minutes à 35 °C. L'impossibilité de conserver un stock d'enzyme complique l'étude de la prolineoxydase, comme d'ailleurs celle d'autres activités mitochondriales. La technique de congélation rapide mise au point par LOOMIS (75) malgré la difficulté de conservation à — 50 °C et la présence dans le milieu de sus-

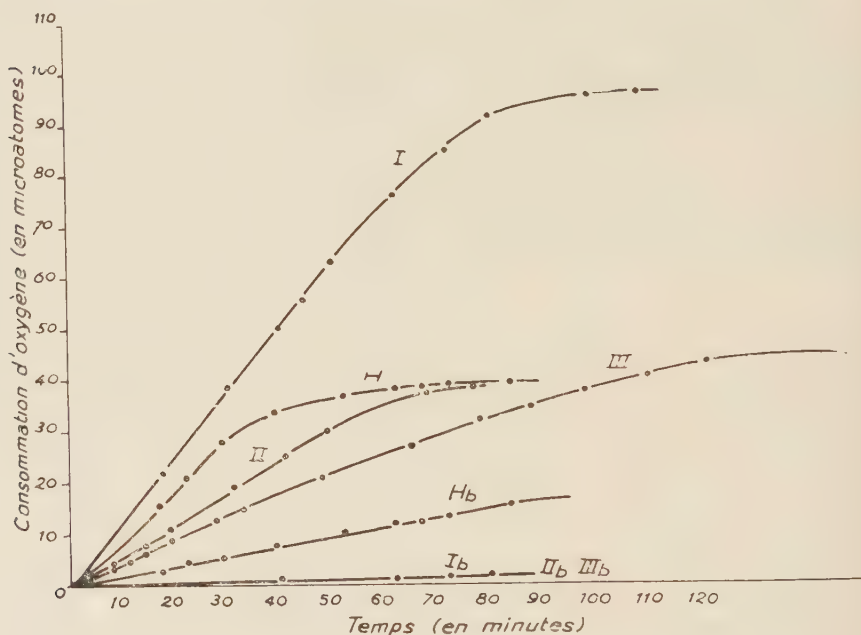


FIG. 3

Influence des lavages sur l'activité des préparations

Mêmes conditions que précédemment.

Courbes H, I, II, III : consommation d'oxygène en présence de proline.

H : par 1 cm³ d'homogénat de départ à 20 %,

I : par 1 cm³ d'homogénat à 20 % lavé 1 fois,

II : par 1 cm³ lavé 2 fois,

III : par 1 cm³ lavé 3 fois (courbe théorique correspondant à la moitié de la consommation d'oxygène de la suspension à 40 % réellement utilisée).

Courbes H_b, I_b, II_b, III_b : respiration endogène des homogénats aux différents stades de lavage. (Les courbes II_b et III_b sont confondues avec l'axe des temps).

pension d'un substrat de l'activité enzymatique qui nous aurait empêché d'isoler l'activité prolineoxydasique des autres manifestations enzymatiques, laisse subsister parfois des pertes d'activité supérieures à 30 % après 24 heures. Aussi ne l'avons-nous pas adoptée et avons-nous préféré répéter, pour chaque préparation, les expériences de référence.

b. CONSOMMATION DE PROLINE

La disparition de proline au cours de la réaction est importante : dans certains cas, compte tenu de la précision des déterminations, on peut considérer que tout

TABLEAU N° 3

Activité des homogénats lavés

HOMOGÉNAT		VITESSE DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE (microsecondes/minute)					ACTIVITÉ spécifique maximum ($\mu\text{At}/\text{mm}^2/\text{mgN}$)	CONSOMMATION TOTALE D'OXYGÈNE (μAt)	CONSOMMATION DE PROLINE (μMol)
POIDS SEC du tissu (mg/cm^3)	AZOTE TOTAL (Kjeldahl) (mg/cm^2)	15 mn	30 mn	60 mn	90 mn	120 mn			
31	3,6	1,3	1,3	1,0	0,75	—	0,36	110	27
26	3,4	1,8	1,6	1,2	0,8	0,3	0,53	142	
26	3,4	1,5	1,4	1,1	0,7	0	0,44	114	
31	3,5	1,7	1,7	1,2	0,9	0	0,48	140	27
31	3,5	1,6	1,6	1,1	0,9	0,1	0,45	130	
28	3,3	1,7	1,7	1,6	0,5	—	0,51	121	24
28	3,3	1,7	1,7	1,6	0,5	—	0,51	120	24
26	3,0	1,7	1,6	1,2	0,9	0,6	0,57	148	26
24	2,7	1,2	1,2	0,7	0,6	0,4	0,42	117	
25	2,7	1,2	1,2	0,7	0,6	0,1	0,42	110	
27	3,2	1,5	1,4	1,2	0,7	0	0,47	120	

le substrat a disparu, ce qui explique l'arrêt assez brutal de la réaction. (Aussi avons-nous été amenés, dans les expériences ultérieures, à augmenter la quantité de proline mise en œuvre). Mais si nos homogénats de foie de rat oxydent plus de proline que les homogénats de rein de lapin préparés par TAGGART (126) cette oxydation n'est pas complète. Le rapport $\frac{\text{microatomes d'oxygène consommé}}{\text{micromolécules de proline disparue}}$ est voisin de 5 alors que la valeur théorique correspondant à une oxydation complète en CO_2 , H_2O et NH_3 serait de 11.

S'accumule-t-il des dérivés de la proline, non oxydés par les préparations hépatiques, alors qu'ils le seraient par les préparations rénales? Dans l'oxydation des acides gras, une telle différence s'observe entre les homogénats de foie de rat, analogues à ceux que nous utilisons, préparés par LEHNINGER (70) et la cyclophorase rénale de GRAFFLIN et GREEN (38). Cette différence relève plus d'une diversité d'assortiment enzymatique des tissus que de l'absence d'un composant essentiel du milieu d'incubation, comme c'était le cas dans les systèmes incomplets décrits par TAGGART (126) où l'absence de membre du système adénylique et de sels de magnésium réduisait non seulement le rapport $\frac{\text{oxygène}}{\text{proline}}$ à une valeur voisine de 2, mais abaissait aussi considérablement la quantité d'oxygène utilisé.

De plus, quelques essais d'analyse des liquides réactionnels par chromatographie sur papier ont révélé la formation d'acide aspartique, à côté de l'acide glutamique déjà trouvé par TAGGART et les auteurs qui s'étaient intéressés auparavant au métabolisme de la proline. Mais, à la différence de l'acide glutamique, l'acide aspartique n'est pas un produit intermédiaire de transformation de la proline. Nous avons vérifié que nos préparations, comme la cyclophorase rénale de GREEN, si elles oxydaient l'acide L-glutamique, étaient sans action sur l'acide L-aspartique. Ce fait explique l'accumulation d'acide aspartique, mais non la différence de comportement des deux types de préparations enzymatiques.

En conclusion, les homogénats de tissu de foie de rat, préparés par un moyen respectant assez bien les structures subcellulaires, présentent lors de l'addition de L-proline, une activité respiratoire supérieure à celle des homogénats de foie ou de rein broyés dans des appareils du type « Mixeur ». L'analyse des milieux d'incubation de ces homogénats par une méthode de microdosage spécifique de la proline, dont ne disposaient pas les expérimentateurs précédents, a mis en évidence le caractère incomplet de l'oxydation de la proline; l'activité des préparations, au point de vue de l'utilisation, tant de l'oxygène que du substrat permet de ne pas considérer cette oxydation partielle comme due à une déficience du système enzymatique.

Il convenait cependant, en raison de cet aspect nouveau du métabolisme hépatique de la proline, tel du moins qu'il apparaît *in vitro* sous l'action d'un homogénat de tissu, d'examiner si, dans des conditions différentes, une oxydation plus complète de cet imino-acide ne pouvait être obtenue au niveau de la cellule hépatique du rat. Aussi avons-nous recherché l'influence, d'une part des différents éléments de la préparation enzymatique en vue de sélectionner le constituant cellulaire actif de l'homogénat et d'éliminer éventuellement les facteurs inhibant son activité prolineoxydasique, d'autre part des conditions physiques et chimiques de la réaction.

CHAPITRE II

LOCALISATION INTRACELLULAIRE
DE L'ACTIVITÉ PROLINEOXYDASIQUE

L'étude de la localisation intracellulaire de la prolineoxydase hépatique présente un double intérêt : spéculatif en premier lieu en ce qu'elle permet de préciser le rôle de l'organisation cellulaire dans ces processus métaboliques, pratique ensuite dans la recherche de préparations enzymatiques d'activité et de stabilité supérieures à celles des simples homogénats cellulaires. Mais de nombreux artefacts peuvent masquer la localisation exacte d'un enzyme. La morphologie des structures cellulaires a en effet tendance à s'altérer dans les homogénats, à la suite de la rupture de la membrane cellulaire. Les propriétés biochimiques peuvent alors se redistribuer entre les divers éléments de la suspension. Pour que la répartition d'une activité enzymatique entre les fractions cellulaires isolées corresponde à sa localisation dans la cellule intacte, il importe comme le soulignait HOGEBOOM (49) que les techniques employées permettent :

— de préserver l'intégrité morphologique des structures cellulaires, tout en désagrégeant la quasi totalité des cellules du tissu, et en isolant les fractions avec un bon rendement;

— d'analyser comparativement au tissu original, toutes les fractions isolées et leurs différentes combinaisons, pour localiser les inhibiteurs ou activateurs éventuels.

Si la localisation de la prolineoxydase au niveau des mitochondries était vraisemblable puisqu'elle avait été bien établie par HOGEBOOM lui-même pour la deshydrogénase glutamique (54), et que de nombreux auteurs avaient montré le rôle d'intermédiaire joué par l'acide glutamique dans l'oxydation de la proline (86), (122), (126), les possibilités d'artefacts ne permettaient pas de considérer comme absolument probantes nos premières observations (107) non plus que celles des autres auteurs (63) (68) qui localisaient à ce niveau l'activité prolineoxydasique de la cellule hépatique sans le support de l'expérimentation rigoureuse définie par HOGEBOOM. Quant à la cyclophorase avec laquelle avait été réalisée l'étude la plus importante à notre connaissance du métabolisme de la proline, ce n'était pas une préparation cytologiquement pure, mais un complexe de mitochondries et de noyaux (52), (113).

Dans ces conditions, nous avons entrepris l'examen systématique de l'activité prolineoxydasique des différentes fractions cellulaires et de leurs combinaisons. Les résultats, déjà partiellement rapportés (108) dépendent des techniques de désintégration cellulaire et de fractionnement, mais aussi de différents constituants du milieu utilisé pour ces opérations, dont nous examinerons l'influence au chapitre suivant.

I. — SÉPARATION DES FRACTIONS CELLULAIRES

Si les techniques de micro-dissection permettaient d'isoler les particules les plus volumineuses et les plus stables de la cellule, en quantités minimales, WARBURG (137) dès 1913 pouvait associer la respiration d'un extrait de foie de rat aux particules arrondies qu'il retenait par filtration à travers une bougie. En 1932, BEHRENS (9) montrait l'activité arginasique de noyaux isolés par flottation dans des solvants organiques. Comme les faibles différences de poids spécifique des éléments cellulaires peuvent être considérablement amplifiées en substituant un champ de force centrifuge à la simple gravité terrestre, BENSLEY (10) isole l'un des premiers des mitochondries en soumettant des préparations de cellules désagrégées à des centrifugations fractionnées en solution de chlorure de sodium à 0,82 %.

Mais HOGEBOOM (51) découvre que, en suspension dans l'eau ou dans des solutions isotoniques tamponnées, les mitochondries subissent d'importantes altérations cytologiques, s'agglutinent et se fixent sur les noyaux, ce qui gêne leur séparation (40 à 80 % de gros granules ne peuvent être récupérés du sédiment nucléaire, malgré des lavages successifs). Ces phénomènes, dus à la force ionique du milieu, sont réduits par l'emploi de solutions de saccharose, à des concentrations maintenant la pression osmotique nécessaire pour éviter l'éclatement des mitochondries. En particulier des solutions hypertoniques (0,88 molaires) de saccharose conservent aux particules isolées la forme allongée et les dimensions des mitochondries dans les cellules intactes. Au contraire, en solution sensiblement isotonique de saccharose (0,25 M) les mitochondries deviennent sphériques.

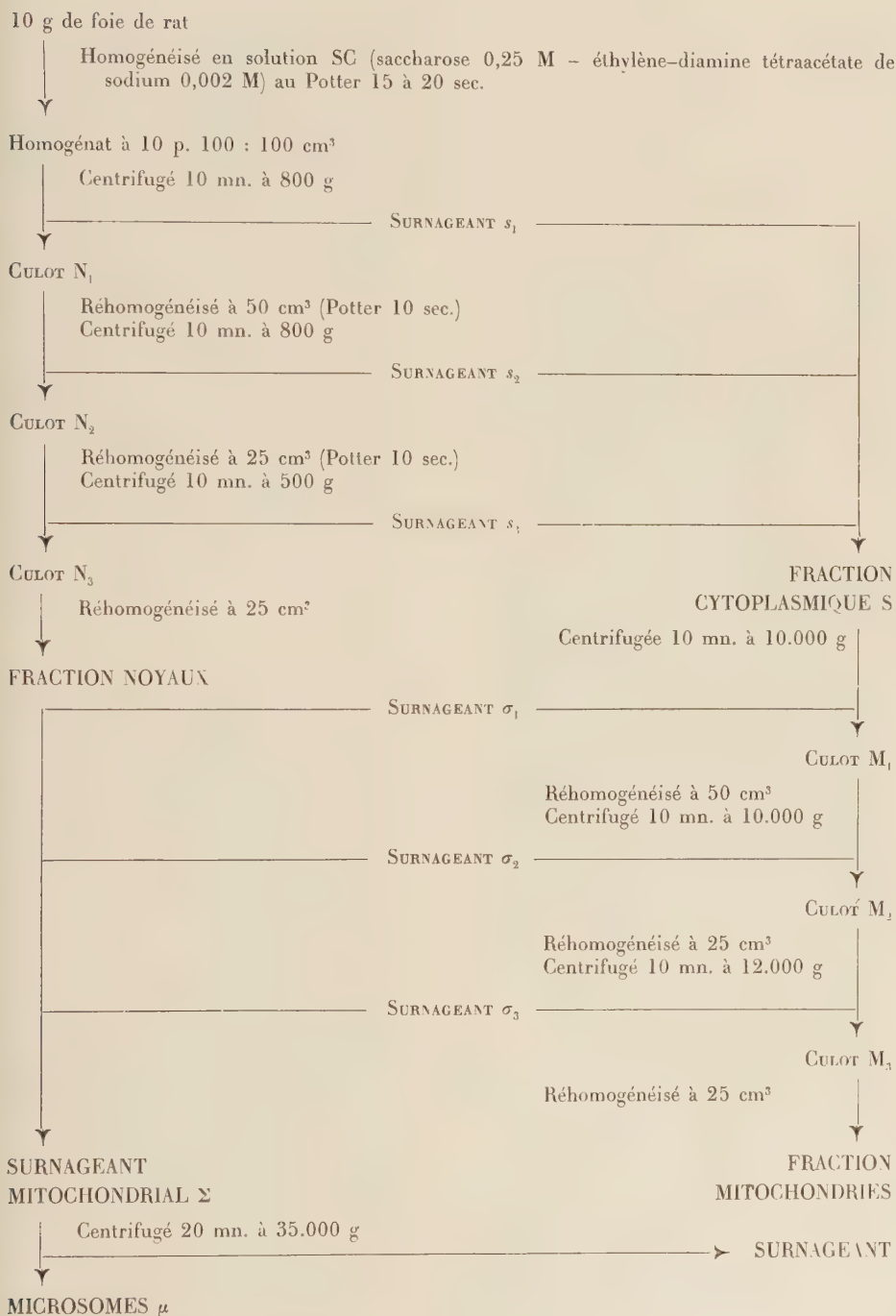
Cependant, l'emploi comme milieu de séparation d'une solution de saccharose 0,88 M impose des accélérations centrifuges élevées, prolonge la durée de la préparation, et, tout au moins avec les centrifugeuses dont nous disposions au début de cette étude (Servall S.S.1 et S.S.2), ne permet pas d'éviter un net échauffement, même en opérant en chambre froide. De plus certains enzymes sont inhibés par de fortes concentrations de saccharose (112). Aussi avons-nous adopté comme HOGEBOOM lui-même d'ailleurs (52) des solutions de saccharose isotonique pour la centrifugation fractionnée des homogénats de foie de rat.

A. TECHNIQUE DE SÉPARATION PAR CENTRIFUGATIONS DIFFÉRENTIELLES

a. Homogénéisation du tissu

Les foies sont prélevés sur les animaux et broyés dans l'homogénéiseur de Potter-Elvehjem suivant la technique indiquée au chapitre I. Mais le milieu de suspension est constitué non plus par une solution isotonique saline, mais par une solution de saccharose 0,25 moléculaire et de sel disodique de l'acide éthylène-diamine tétraacétique (complexon) 0,002 moléculaire. Le tissu est broyé rapidement (deux mouvements d'allée et venue du piston jusqu'au fond du tube de l'homogénéiseur) par fractions de 4 à 5 grammes en présence d'environ 10 centimètres-cubes de solution de saccharose-complexon glacée. Ce bref broyage, lésant au minimum les mitochondries, laisse quelques cellules intactes mais celles-ci sont désagrégées au cours des remises en suspension ultérieures des culots sédimentés à faible vitesse, et très appauvris en mitochondries. Une homogénéisation prolongée, telle que la pratique CHAUEAU (21) si elle libère en une fois toutes les structures cellulaires, risque de les altérer considérablement.

TABEAU N° 4



La suspension ainsi obtenue est diluée par la solution de saccharose-complexon pour obtenir un homogénat sensiblement à 10 p. 100 (poids de tissu frais/volume de suspension).

b. Centrifugations différentielles et lavages

L'homogénat est soumis à la suite de centrifugations indiquées dans le tableau 4 à l'aide de la centrifugeuse angulaire Servall S.S.1. en chambre froide pour maintenir la température des préparations entre -2°C et $+2^{\circ}\text{C}$. La séparation des microsomes a été réalisée dans la centrifugeuse sous vide Servall S.S.2, ce qui n'a pas évité un certain échauffement des suspensions (jusqu'à $+10^{\circ}\text{C}$). Après avoir prélevé le liquide surnageant à l'aide d'une pipette capillaire munie d'une poire d'aspiration (Propipette), on recueille le culot dans le tube de l'appareil de Potter, et on le remet en suspension dans une nouvelle solution de saccharose-complexon. Les accélérations centrifuges sont calculées pour le fond des tubes, d'après les vitesses de rotation du rotor, mesurées avec un stroboscope portatif (Stroboret).

Le culot N_1 , constitué de noyaux, de cellules intactes et de débris cellulaires contient également de nombreuses mitochondries (microphotographie 1, planche I, page 24). Il est à deux reprises remis en suspension à l'aide de l'homogénéiseur de Potter dans des volumes de solution réduits de moitié chaque fois et recentrifugé comme il est indiqué sur le tableau 4. La concentration des suspensions ne nuit pas à l'efficacité des séparations : on voit sur la microphotographie 2 (planche I) que les mitochondries sont devenues rares dans la fraction N_3 , alors que, agglutinées entre elles et avec les noyaux sous l'influence des sels cytoplasmiques, elles se sédimentaient avec les noyaux au cours de la première centrifugation. Cette réduction du volume des suspensions pour les lavages successifs permet ainsi, sans nuire à la qualité de la séparation, d'obtenir une fraction cytoplasmique S assez concentrée pour ne pas dépasser la capacité de la centrifugeuse.

Une centrifugation de cette fraction S à 10 000 gravités permet de sédimenter les mitochondries sans une trop grande contamination par les microsomes. La surface du liquide surnageant est couverte par une pellicule lipidique assez importante, vraisemblablement détachée des mitochondries dont elle gêne la sédimentation. Nous verrons au chapitre suivant qu'en l'absence de complexon, cette couche grasseuse est moins importante et que la quantité de particules récupérées est plus faible. Aussi a-t-on songé (21) à faciliter les séparations en éliminant au préalable ces lipides par une centrifugation prolongée à grande vitesse. Si celle-ci facilite les études cytologiques, la durée accrue de la préparation, et l'échauffement l'accompagnant inévitablement, altèrent les enzymes associés aux structures intracellulaires.

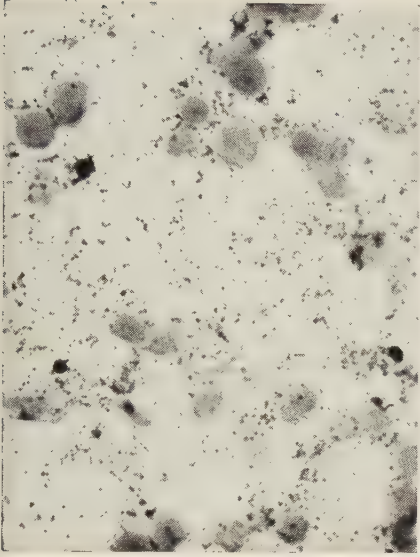
Ainsi qu'il a été fait pour les noyaux, le culot mitochondrial est lavé deux fois le volume de la suspension étant chaque fois réduit de moitié. Pour obtenir rapidement une suspension bien homogène, le culot est traité dans l'appareil de Potter et l'on peut certes craindre la rupture de quelques mitochondries au cours de ces homogénéisations répétées.

B. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES D'OBSERVATION

L'étude de l'identité des différentes fractions ainsi obtenues a été basée sur des observations cytologiques (microscopie des préparations non fixées, en contraste de phase, ou après fixation et coloration, microscopie électronique). Cependant

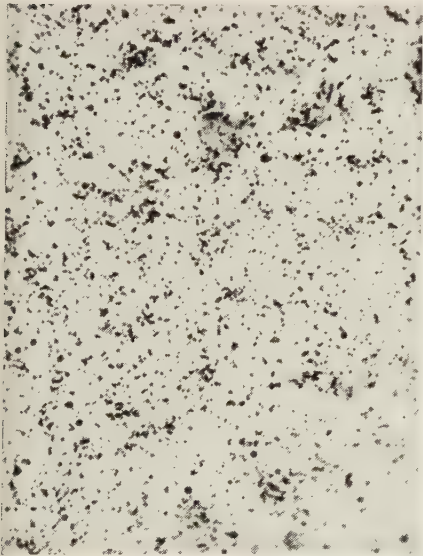
PLANCHE I

PHOTOGRAPHIES DE FRACTIONS CELLULAIRES
OBSERVÉES AU MICROSCOPE OPTIQUE



Microphotographie n° 1

Culot N₁ riche en noyaux et en mitochondries



Microphotographie n° 3

Culot M₃ mitochondries



Microphotographie n° 2

Culot N₃ les mitochondries sont beaucoup
plus rares

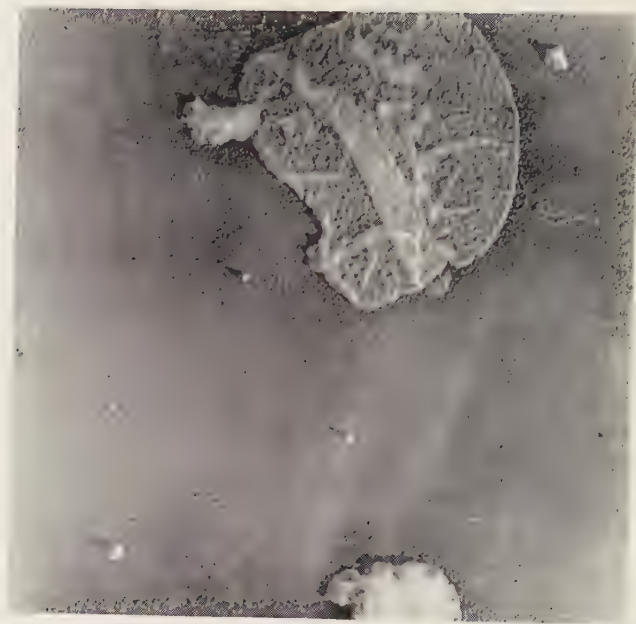
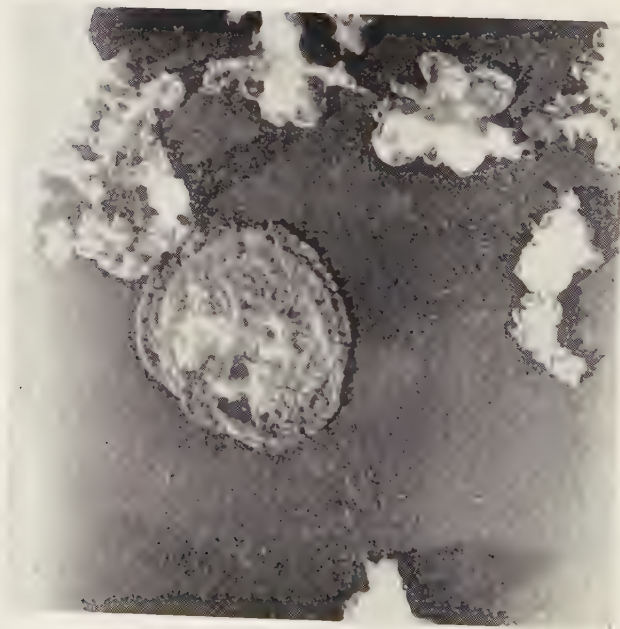
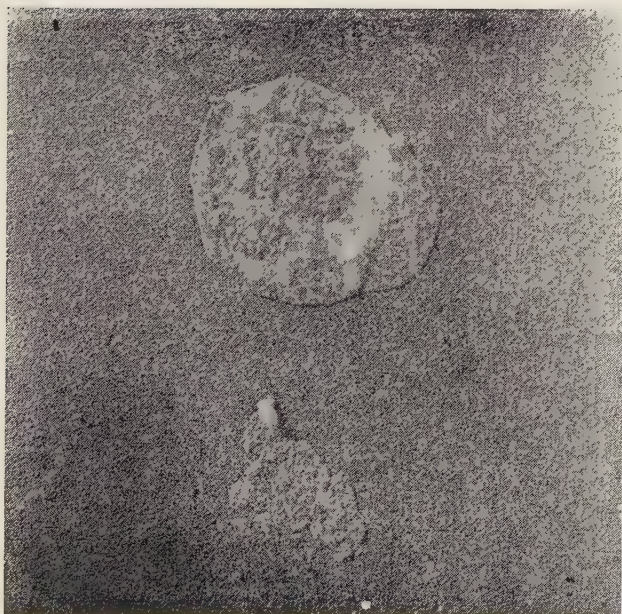
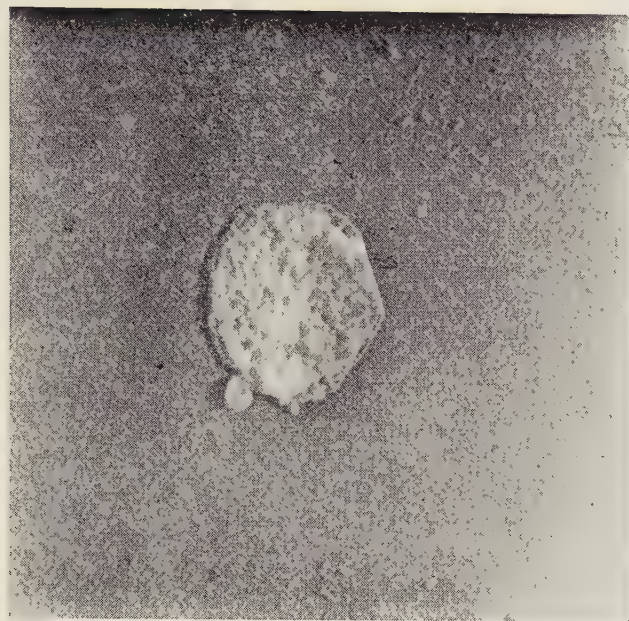


PLANCHE II
MITOCHONDRIES FIXÉES PAR L'ACIDE OSMIQUE EN SOLUTION



A



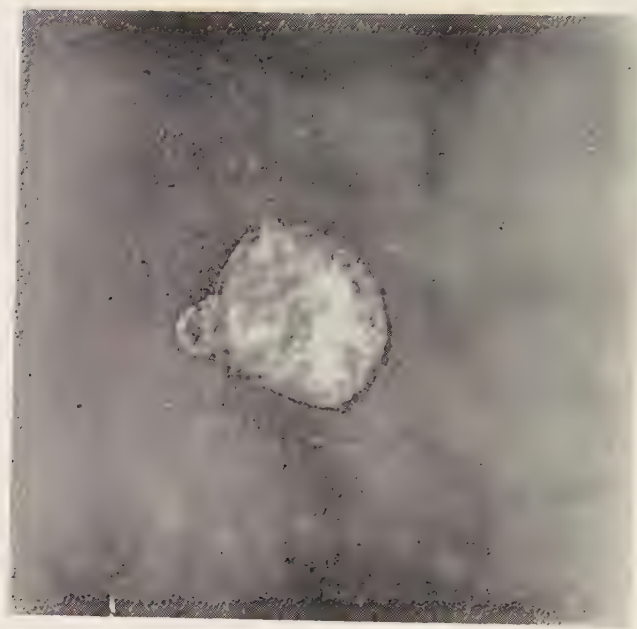
B

PLANCHE III

MITOCHONDRIES FIXÉES AUX VAPEURS D'ACIDE OSMIQUE



A



B

PLANCHE III *bis*
MITOCHONDRIES FIXÉES AUX VAPEURS D'ACIDE OSMIQUE

on ne peut exclure la possibilité d'une hétérogénéité de la fraction mitochondriale qui se traduit par la multiplicité des couches de sédimentation dans le culot mitochondrial [cf. chapitre III, tableau 6] (93).

a. Microscopie optique

A partir des différentes fractions, on réalise des frottis humides sur lame, que l'on surfixe en phase vapeur par une solution de tétraoxyde d'osmium à 2 p. 100 pendant 24 heures à la température ambiante. Cette fixation prolongée mordance les mitochondries, et facilite leur coloration ultérieure.

L'excès de fixatif est éliminé par une demi-heure de lavage à l'eau courante, suivie d'un lavage d'une demi-heure dans l'eau distillée. Après séchage dans l'alcool à 70° les lames sont colorées suivant la technique de KULL (61) rapportée par BAKER (6):

Les mitochondries sont colorées à la fuschine anilinée d'ALTMANN (5) sur platine chauffante (l'action du colorant étant poursuivie une minute après le début de l'émission des vapeurs). L'excès de réactif est éliminé par un jet d'eau distillée. Une solution aqueuse de bleu de toluidine à 1 p. 100 teinte alors la chromatine en bleu, et différencie partiellement la fuschine (durée : 2 minutes). Après lavage, la lame est immergée 30 secondes dans une solution alcoolique d'aurantia, pour achever la différenciation.

Les mitochondries apparaissent ainsi en rouge et les noyaux en bleu-mauve sur un fond jaunâtre (microphotographie 3).

b. Microscopie électronique

Pour l'observation au microscope électronique, on a eu également recours à la fixation par l'acide osmique :

— soit en solution (à 1 cm³ de suspension d'une fraction cellulaire, on ajoute 1 cm³ de solution d'acide osmique à 2 p. 100. Après 24 heures à 0 °C, on centrifuge et lave deux fois le culot à l'eau bidistillée. Les mitochondries ainsi fixées et lavées sont remises en suspension dans l'eau distillée et une microgoutte de suspension est déposée sur une grille de nickel);

— soit en phase vapeur (la suspension de mitochondries à 20 p. 100 dans le saccharose est diluée dans l'eau bidistillée glacée, et une microgoutte de cette dilution est déposée sur la grille de nickel. L'ensemble est placé sous cloche, en présence d'une solution à 2 p. 100 d'acide osmique).

Après fixation, les préparations sont séchées pendant au moins 48 heures sur acide sulfurique, et sont, soit observées directement, soit ombrées pour accroître le relief et protéger la préparation de l'action destructrice des électrons.

Comme lors des préparations colorées pour observation au microscope optique, on observe une agglutination plus marquée des mitochondries fixées par l'acide osmique en solution que de celles fixées en phase vapeur, agglutination dont on a un aperçu sur la photographie A de la planche II, mais qui conduit souvent à des préparations inobservables qui n'ont pas été photographiées. Il apparaît également dans les premières, une structure granulaire un peu plus accusée que dans les autres. Le bord des mitochondries a en particulier un profil de falaise déchiquetée, apparaissant moins sur les préparations fixées par les vapeurs d'acide osmique. Enfin il est difficile, malgré les lavages répétés, d'éliminer de la préparation des

micrograins d'acide osmique, qui se reconnaissent sur la photographie II A par leur opacité complète, et leur ombre importante.

Les préparations mitochondriales fixées par les vapeurs d'acide osmique après dilution de la suspension de saccharose dans l'eau distillée se montrent plus lisibles. On pouvait craindre que la remise en suspension dans l'eau bidistillée n'entraîne, du fait de la pression osmotique, l'éclatement des mitochondries, mais le gonflement attendu laisse intacte de nombreuses particules (planches III et III *bis*) sans doute parce que la dilution réalisée avec de l'eau glacée est immédiatement déposée sur les grilles d'observation et portée sous la cloche de fixation. On observe cependant des excroissances de la substance intramitochondriale à l'extérieur de la membrane (planche III, photo A; planche III *bis*, photos A et B) et une rupture parfois nette de cette membrane (III *bis* A). Mais de telles excroissances s'observent également lors des fixations par une solution d'acide osmique (II B) et en général le contenu mitochondrial paraît appauvri par cette fixation.

La fixation des mitochondries par les vapeurs d'acide osmique, fournit des clichés du type de ceux publiés par d'autres auteurs (21) (51). Ce mode opératoire est peut-être insuffisant pour la fixation de prélèvements d'organes, mais convient très bien à des suspensions de particules isolées. Il pourrait être intéressant de préciser son influence sur les structures intramitochondriales par les techniques d'inclusion et de coupe de corpuscules mises au point ces dernières années, mais les observations présentes ont permis de constater que les corpuscules isolés étaient bien des mitochondries et que globalement elles n'étaient pas lésées par la méthode de fractionnement.

II. — MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS

L'activité prolineoxydasique des différentes fractions cellulaires est suivie par les méthodes précédemment utilisées dans l'étude des homogénats lavés, et indiquées au chapitre I :

Mesure de la consommation d'oxygène par la méthode manométrique directe de Warburg (UMBREIT 130);

Mesure de la quantité de proline disparue par la méthode de CHINARD à la ninhydrine (22).

Chaque fiole de Warburg contient :

8 μM de SO_4Mg ; 150 μM de KCl ; 60 μM de phosphate de sodium pH 7,4 30 μM d'acide adénosine-5-phosphorique (AMP); 60 μM de L(—)proline; et dans le puits central 0,2 centimètre cube de potasse à 10 p. 100 avec un fragment de papier filtre.

On ajoute dans chaque fiole à ce mélange glacé un volume de la fraction étudiée correspondant à 1 centimètre cube d'homogénat initial à 10 p. 100, et afin que le milieu d'incubation des différentes fractions soit identique, on complète le volume à 2,8 centimètres cubes par une solution de saccharose 0,25 M.

Nous examinerons dans les chapitres suivants l'influence de ces divers constituants, qui se trouvent ici employés sensiblement à leur concentration optimum. De même la température choisie pour ces essais comparatifs est sensiblement la

température optimum pour l'activité prolineoxydasique des mitochondries, soit 37 °C. Seule la concentration de la suspension mitochondriale — et peut-être celle des autres fractions — ne correspond pas à la valeur optimum, en raison de la nécessité d'avoir dans chaque fiole une quantité de tissu correspondant à 1 centimètre cube d'homogénat. Les fioles sont oxygénées pendant une dizaine de minutes avant le début des mesures.

La consommation d'oxygène pendant la période d'oxygénation et d'équilibrage de la température est déterminée par extrapolation, pour les raisons invoquées au chapitre I.

Résultats :

Les figures 4 et 5 représentent dans une même expérience l'évolution de la consommation d'oxygène en fonction du temps pour les différentes fractions cellulaires.

Il faut noter que, en raison de la durée de la préparation : 4 heures pour obtenir les mitochondries M_1 — 5 heures pour obtenir les mitochondries M_3 — les mesures manométriques ont dû être interrompues avant l'arrêt de la consommation d'oxygène pour certaines fractions. Pour l'expérience représentée par les courbes de la figure 5 au bout de 400 minutes la consommation d'oxygène de la fraction M_1 en présence de proline était encore de 0,30 $\mu\text{At}/\text{mn}/\text{mgN}$ (microatome par minute et par milligramme d'azote) [contre 0,48 pour l'activité maximum]. Au bout de 300 minutes pour la fraction M_2 de 0,24 $\mu\text{At}/\text{mn}/\text{mgN}$ (contre 0,49 pour l'activité maximum). Au bout de 200 minutes pour la fraction M_3 de 0,25 $\mu\text{At}/\text{mn}/\text{mgN}$ (contre 0,43 pour l'activité maximum). N'ayant pas poursuivi les expériences jusqu'à l'arrêt de la réaction en présence des fractions enzymatiques les plus stables, nous avons limité les courbes à 250 minutes afin de maintenir au graphique une échelle acceptable.

On constate que varient avec les fractions, la vitesse de la consommation d'oxygène, ainsi que la quantité totale d'oxygène consommé jusqu'à l'arrêt de la réaction. La vitesse maximum de la consommation d'oxygène mesurée par la pente de la courbe de consommation dans sa partie rectiligne traduit l'activité de la fraction. Pour que les valeurs soient comparables d'une expérience à l'autre, on a exprimé cette vitesse soit en microatomes d'oxygène consommé par minute par une quantité de fraction cellulaire renfermant 1 milligramme d'azote — c'est alors l'*activité spécifique maximum*, soit en pourcentage de la vitesse maximum de concentration de l'homogénat initial — chaque fraction provenant de 1 centimètre cube d'homogénat — c'est le *pourcentage d'activité* des différentes fractions. La moyenne de ces valeurs pour les différentes expériences est portée sur les graphiques ci-dessous (fig. 6), que nous avons eu précédemment l'occasion de présenter (108).

Les mitochondries transforment également une quantité de proline supérieure à celle qu'oxyde l'homogénat de foie brut (fig. 7)

Mais les résultats sont plus complexes car les valeurs indiquées correspondent au montant de L-proline transformée pendant tout le temps où l'incubation s'accompagne d'une consommation d'oxygène et non à la vitesse de transformation. Ils font donc intervenir l'activité enzymatique de la fraction cellulaire, en même temps que sa labilité, les fractions les moins stables n'étant à même d'opérer cette transformation que pendant un temps plus court.



FIG. 4 ET 5

Consommation d'oxygène des différentes fractions cellulaires en présence de L-proline

Signification des symboles, voir tableau 4.

Composition du milieu d'incubation, voir page 26.

DISCUSSION

a. Localisation mitochondriale de la prolineoxydase :

L'examen des courbes montre tout d'abord que l'activité enzymatique des fractions mitochondriales est stable beaucoup plus longtemps que celle des autres fractions ou de l'homogénat. Le facteur d'instabilité dans ce dernier paraît être localisé dans le liquide cytoplasmique, tel qu'il reste après sédimentation des noyaux et des mitochondries puisque :

1° La durée d'activité de la préparation cytoplasmique globale « S » est du même ordre de grandeur que celle de l'homogénat initial H et bien inférieure à celle des mitochondries qui en sont isolées ;

2° La durée d'activité de la fraction mitochondriale lavée, M_3 , est réduite par l'addition du liquide de lavage de ces mitochondries « Σ ».

L'addition des noyaux au contraire ne modifie sensiblement pas la stabilité de la prolineoxydase portée par les mitochondries.

Pour ce qui est de l'activité des diverses fractions, on voit d'après les deux graphiques de la figure 6 que les mitochondries lavées une fois (fraction M_2) présentent l'activité spécifique maximum, légèrement diminuée par un deuxième lavage aboutissant à la fraction M_3 . Comparativement l'activité des autres fractions cellulaires isolées : noyaux centrifugés trois fois : N_3 ; surnageant des mitochondries : Σ ; microsomes : μ , est négligeable. Seuls les noyaux conservent après deux lavages une certaine activité, très vraisemblablement due aux mitochondries qui n'ont pas été éliminées et qui apparaissent à l'examen microscopique [environ 10 p. 100 d'après HOCEBOOM (50)] : en effet au cours des lavages quand les homogénéisations successives des culots ont désintégré les cellules intactes restantes et que les centrifugations à vitesse relativement faible ont laissé la majorité des mitochondries en suspension, l'activité tant en valeur spécifique qu'en pourcentage de l'activité de l'homogénat initial se trouve réduite d'une manière considérable.

Le lavage des mitochondries n'entraîne pas une diminution d'activité comparable, les mitochondries M_2 lavées une fois présentent même une activité spécifique supérieure aux mitochondries M_1 , vraisemblablement par suite de l'élimination au cours du lavage de particules submicroscopiques ou de protéines inactives dans une mesure qui dépasse la perte des mitochondries de la préparation par dégradation et rupture au cours de la réhomogénéisation des culots. Cette perte en matériel actif n'est cependant pas négligeable puisqu'elle se traduit par une chute de 65 à 55 p. 100 environ du pourcentage d'activité de l'homogénat initial récupérée dans la fraction mitochondriale, quand on passe de M_1 à M_2 .

Mais cette perte de mitochondries apparaît plus nettement après la troisième centrifugation, sédimentant les mitochondries M_3 , et se traduit cette fois par une diminution tant du pourcentage d'activité récupérée que de l'activité spécifique, cette dernière pouvant être due à une rupture de la membrane mitochondriale au cours des réhomogénéisations, libérant dans le liquide surnageant des protéines mitochondriales actives, et laissant dans le culot une trame inactive.

Même si ce deuxième lavage élimine quelques microsomes, précédemment sédimentés avec les mitochondries, cette purification ne peut expliquer la diminution de l'activité enzymatique, puisque le pourcentage d'activité récupérée dans la combinaison des mitochondries M_3 et du surnageant Σ de leur centrifugation, renfermant

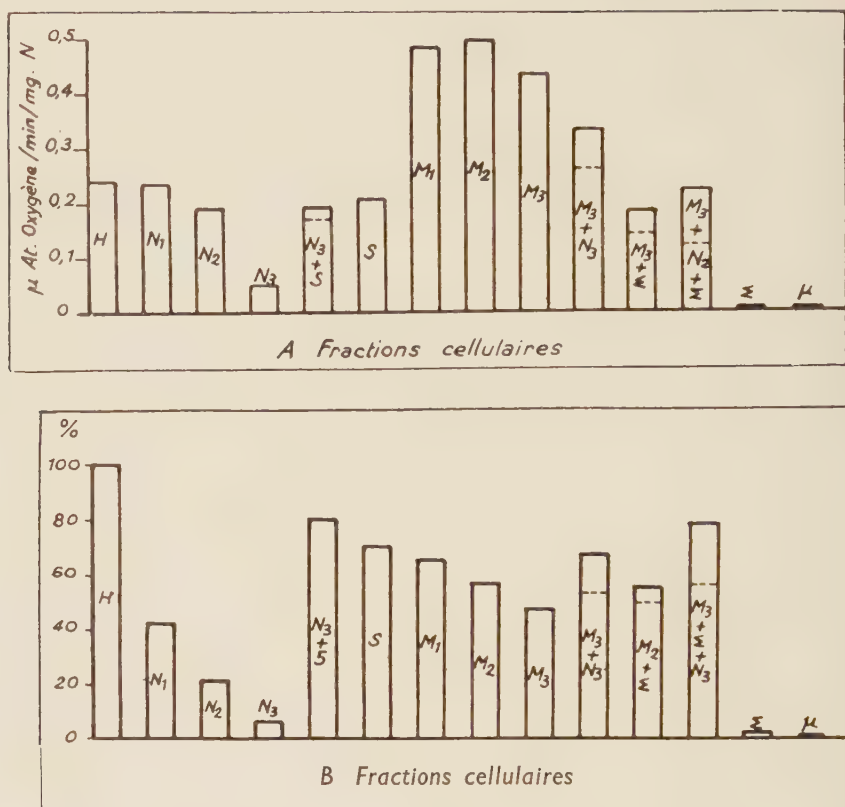


FIG. 6

A. *Activité spécifique maximum* des différentes fractions cellulaires et de leurs combinaisons (... : activité spécifique théorique des combinaisons).

B. *Pourcentage d'activité* des différentes fractions et de leurs combinaisons (... : somme des activités des diverses fractions d'une combinaison).

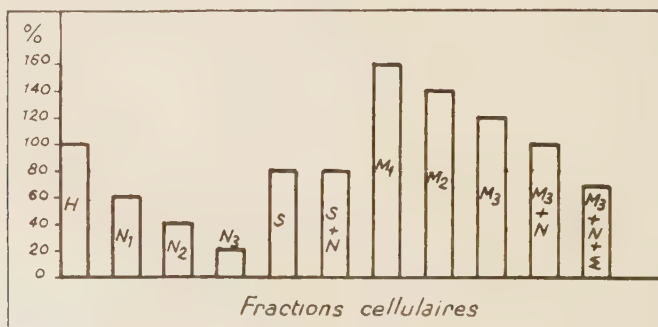


FIG. 7

Proline transformée par les différentes fractions cellulaires, en % du substrat transformé par une quantité équivalente d'homogénat

ces microsomes, est très nettement inférieur à l'activité des mitochondries non lavées M_1 (fig. 6, B). Certes, à la différence des auteurs qui ont eu en vue plus la pureté des fractions séparées que le rendement quantitatif de cette séparation (44) nous n'avons pas éliminé la couche supérieure rosé-crème légère du culot mitochondrial (tableau 6, stade M_2) où certains voient un mélange de mitochondries, de particules denses et de gros microsomes (89) (90). En effet à l'issue de la troisième centrifugation, cette couche est très bien sédimentée, et le surnageant peut être décanté sans aucune précaution. De plus les observations au microscope électronique n'ont pas montré de particules de forme régulière, d'un diamètre de l'ordre de $0,1 \mu$, pouvant correspondre aux gros microsomes : il faudrait donc admettre que ces microsomes seraient lésés au cours des séparations qui n'altèrent pas les mitochondries, alors qu'ils apparaissent en plus grand nombre que les mitochondries dans des clichés de préparations mitochondriales non lavées (13).

Ces preuves nous ont paru suffisantes pour affirmer (108) la localisation mitochondriale de l'activité prolineoxydasique des cellules hépatiques chez le rat. Mais les autres fractions cellulaires jouent un certain rôle dans cette oxydation. Ce rôle, indirect puisque ces fractions ne présentent pas d'activité propre, se manifeste dans les recombinaisons des diverses fractions, dont l'activité est indiquée dans les graphiques de la figure 6. L'influence négative de ces fractions, et principalement du surnageant mitochondrial Σ sur la stabilité de la préparation de mitochondries a déjà été examinée. Mais ces fractions ont également un effet positif de stimulation de l'activité mitochondriale, qui apparaît principalement sur le graphique B.

b. Rôle des autres fractions cellulaires sur l'activité mitochondriale :

La recombinaison noyaux centrifugés trois fois (N_3) et mitochondries centrifugées trois fois (M_3) présente environ 67 p. 100 de l'activité de l'homogénat initial au lieu de 47 p. 100 pour les mitochondries seules.

De même la combinaison du surnageant mitochondrial Σ , soit avec les mitochondries M_3 seules, soit avec le combinat mitochondries + noyaux ($M_3 + N_3$) stimule l'activité respectivement des fractions M_3 et ($M_3 + N_3$).

Dans tous ces cas, le pourcentage de l'activité de l'homogénat initial retrouvé dans la combinaison est supérieur à celui qui pourrait être calculé en additionnant les pourcentages de chacun des constituants. De même l'activité spécifique des combinaisons est supérieure à l'activité calculée à partir de l'activité spécifique et du taux d'azote de chaque fraction. (Dans les deux cas, ces activités calculées ont été représentées en pointillé sur le graphique.)

Ce fait peut s'expliquer en partie par l'influence inhibitrice de la dilution sur les quelques mitochondries se retrouvant dans les fractions N_3 ou Σ (Cette influence sera étudiée en détail au chapitre suivant en utilisant des mitochondries pures.) Ces mitochondries, se retrouvant dans un milieu beaucoup plus riche en ces corpuscules à la suite de la combinaison à la fraction N_3 des fractions où elles se trouvent à titre de contaminants, peuvent apporter une activité supérieure à celle qu'elles présentent dans leur fraction isolée.

Il est peu probable que le surnageant agisse par apport d'enzymes oxydatifs solubles, ou à localisation microsomiale puisque le rapport de l'oxygène consommé à la proline disparue n'est pas sensiblement modifié par l'addition de Σ aux mitochondries. Cette influence s'exercerait plutôt sur les phosphorylations qui, comme nous le verrons ultérieurement, accompagnent normalement l'oxydation de la proline, la rupture des liaisons phosphorylées riches en énergie sous l'influence de

l'adénosinetriphosphatase des fractions nucléaires ou microsomiales régénérant des accepteurs de phosphate particulièrement actifs (68) (99). L'hydrolyse des liaisons phosphate par des composés chimiques, comme le dinitrophénol, provoque en effet une stimulation de la respiration, mais par contre l'abaissement du niveau des esters phosphoriques riches en énergie qui en résulte est un facteur d'instabilité des préparations. De plus les noyaux pourraient stimuler directement la phosphorylation oxydative (62).

L'oxydation de la L-proline par les homogénats de foie de rat est donc essentiellement le fait des mitochondries, au niveau desquelles la prolineoxydase présente une activité spécifique et une stabilité beaucoup plus grande que n'en avaient jamais manifestées les préparations précédemment décrites. Cette supériorité des mitochondries pures sur les préparations complexes, et le fait que l'étude de cette localisation ait été conduite suivant le protocole rigoureux défini par HOGEBOOM permettent d'écarter la possibilité d'artefacts dans cette localisation, artefacts qui pouvaient fausser les résultats précédemment publiés.

Mais comme pour la plupart des enzymes dont on a étudié la répartition intracellulaire, les autres fractions stimulent l'activité prolineoxydasique des mitochondries, tout en en réduisant sensiblement la stabilité. Ce fait, dont l'interprétation reste délicate, n'avait encore jamais été démontré dans l'oxydation de la proline. Ces deux influences contradictoires peuvent ne pas s'exercer de la même façon dans la cellule intacte, où les systèmes enzymatiques possèdent une organisation que fait disparaître l'homogénéisation, mais l'utilisation des mitochondries permet d'approcher au mieux la réaction cellulaire fondamentale, d'autant que ces particules sont responsables de l'oxydation de composés considérés comme des intermédiaires du métabolisme de la proline [acide glutamique (54), membres du cycle tricarboxylique (70)].

Les avantages présentés par les mitochondries justifient donc l'utilisation pour l'étude de l'oxydation de la L-proline d'un matériel enzymatique d'une préparation plus laborieuse que les homogénats bruts, ou lavés du type cyclophorase.

CHAPITRE III

FACTEURS INFLUENÇANT L'ACTIVITÉ PROLINEOXYDASIQUE
DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE RAT

AU COURS DE LA SÉPARATION DES CONSTITUANTS CELLULAIRES

Nous avons établi au chapitre précédent la localisation mitochondriale de l'activité prolineoxydasique dans les cellules hépatiques du rat, activité enzymatique trouvée au départ dans les homogénats lavés du type cyclophorase.

L'activité des différentes fractions a été mesurée dans les conditions optima pour la prolineoxydase mitochondriale. En effet, ces conditions ont été définies préalablement à l'étude systématique de la répartition intracellulaire de l'enzyme dès que l'on a trouvé dans les mitochondries, isolées selon la méthode d'HOGEBOM (52) en solution de saccharose 0,25 moléculaire, une notable activité enzymatique. Le fait que l'on retrouve par recombinaison des fractions isolées près de 80 p. 100 de l'activité de l'homogénat initial autorise à ne pas rechercher systématiquement pour chacune des fractions étudiées au chapitre précédent des conditions optima particulières, et à considérer que celles-ci n'auraient pas modifié la répartition trouvée pour l'activité prolineoxydasique.

La séparation de mitochondries conservant au mieux cette activité enzymatique va dépendre de la composition du milieu d'homogénéisation et de centrifugation, et de la technique de désagrégation cellulaire.

Certains de ces points ont déjà été examinés dans les chapitres précédents (supériorité de l'homogénéiseur de Potter établie déjà avec les homogénats lavés, intérêt des solutions de saccharose comme milieu d'isolement des mitochondries pour éviter des altérations importantes).

Mais la méthode de préparation d'HOGEBOM ne nous fournissait pas une reproductibilité suffisante de l'activité prolineoxydasique, l'enzyme intéressé se montrant beaucoup plus labile que la succinoxydase et se rapprochant à ce point de vue de l'oxydase α -cétoglutarique. Aussi avons-nous essayé de stabiliser la prolineoxydase des mitochondries hépatiques en ajoutant au milieu de séparation de l'éthylène-diamine tétraacétate de sodium, agent complexant utilisé par SLATER (117) pour stabiliser l'oxydase α -cétoglutarique des sarcosomes de cœur.

Au cours de ces dernières années des milieux de complexité croissante ont d'ailleurs été essayés pour l'isolement des mitochondries au fur et à mesure que, disposant de moyens d'observation plus puissants, les chercheurs formulaient des exigences plus grandes sur l'intégrité et l'absence de contamination des mitochondries isolées : addition au milieu saccharose de base d'une trace d'acide citrique (141) ou d'une certaine quantité de polyvinylpyrrolidone (88), remplacement du saccharose par d'autres glucides, raffinose, dextrane, additionnés de complexon, d'héparine et d'AMP (14).

I. — FACTEURS CHIMIQUES : COMPOSITION DU MILIEU DE SÉPARATION

Les appareils dont nous disposions au début de cette étude ne nous permettant pas les grandes accélérations centrifuges nécessaires aux séparations en solution de saccharose hypertonique, nous avons adopté comme milieu de base pour la séparation une solution de saccharose isotonique 0,25 M dont nous avons indiqué au chapitre II l'avantage sur les solutions salines, qui provoquent des agglutinations et d'importantes altérations cytologiques des mitochondries. Mais les électrolytes de ces solutions ont l'avantage de tamponner le milieu de suspension, ce qui n'est pas le cas avec les solutions de saccharose isotonique. Cette absence de pouvoir tampon n'a pas eu d'effet défavorable dans l'isolement des mitochondries hépatiques, les variations de pH étant assez réduites, comme le montre le tableau ci-dessous.

MILIEU	pH
Milieu d'homogénéisation et de centrifugation :	
Saccharose 0,25 M.....	5,1
Ethylène-diamine tétraacétate de sodium 0,002 M.....	
Homogénat de foie à 10 % (3,3 mg d'azote par cm ³)	6,0
Suspension de mitochondries à 40 % (4,4 mg d'azote par cm ³)	6,0

La séparation des mitochondries d'autres tissus imposerait peut-être l'addition à la solution de saccharose d'une substance tampon, malgré les risques d'altération des mitochondries, pour éviter une acidification par les constituants cellulaires. Ainsi dans la préparation de cyclophorase à partir de rein de lapin devait-on (42) neutraliser constamment le milieu par addition de soude au cours de l'homogénéisation.

A la suite des travaux de SLATER (117) sur la stabilisation des activités enzymatiques des sarcosomes cardiaques par l'addition d'éthylène diamine tétraacétate de sodium aux milieux d'incubation, nous avons examiné le bénéfice que nous pourrions tirer de l'addition de cet agent complexant au milieu de séparation. Les premiers résultats très satisfaisants quant à l'amélioration de la stabilité et de la reproductibilité des préparations nous ont conduits à examiner systématiquement l'influence de ce facteur.

L'éthylène-diamine tétraacétate de sodium (EDTA ou complexon) agit :

- 1° Sur la sédimentation des particules en facilitant la séparation des mitochondries;
- 2° Sur l'activité prolineoxydasique des mitochondries isolées.

A. INFLUENCE DU COMPLEXON SUR LA SÉDIMENTATION

Pour comparer les mitochondries isolées dans un milieu formé par une solution de saccharose isotonique (0,25 M) aux mitochondries séparées dans un milieu

renfermant en outre de l'EDTA (à une concentration de 0,002 M) une certaine quantité de foies de rats a été homogénéisée dans l'appareil de Potter, suivant la technique précédemment décrite, en présence d'une simple solution de saccharose 0,25 M, de manière à obtenir un homogénat à 10 p. 100 (désigné sous le terme d'homogénat initial). Cet homogénat était partagé en deux parties égales, et l'on ajoutait à l'une des moitiés la quantité d'EDTA nécessaire pour obtenir une concentration finale de 0,002 M sous forme d'une solution de concentration 0,1 M, ne diluant donc pas sensiblement l'homogénat. Ces deux homogénats, l'un en saccharose, l'autre en saccharose plus EDTA, étaient centrifugés simultanément pour éliminer l'influence de faibles variations de vitesse de rotation de la centrifugeuse, toujours possibles d'une expérience à l'autre. Dans ces conditions, la préparation de départ à fragmenter en ses divers constituants cellulaires et les conditions opératoires de cette séparation sont rigoureusement les mêmes. Les différences observées entre les préparations ne peuvent alors provenir que de l'EDTA. Les tableaux suivants mettent ces différences en évidence.

En plus de l'influence de l'EDTA, ces tableaux indiquent l'effet de l'addition d'un sel de calcium au milieu de séparation. Adoptant comme hypothèse de travail la théorie de SLATER (118) selon laquelle l'action générale de l'EDTA, que nous avons observée dans des expériences préliminaires, serait due à la formation de complexes avec le calcium intratissulaire, nous avons voulu voir si l'addition d'un sel de calcium avait un effet contraire à celui de l'EDTA.

Pour les raisons précédemment indiquées, ces expériences comparatives ont été conduites en partageant en trois fractions égales un homogénat de foie réalisé en milieu saccharose isotonique simple, et en ajoutant avant les centrifugations à chacune de ces fractions l'agent dont on voulait étudier l'influence. Toutes les centrifugations ont été menées simultanément sur chacune de ces fractions.

a. Isolement des noyaux par centrifugation lente :

La présence d'un électrolyte (CaCl_2) même à une concentration relativement faible (0,004 M) provoque un gonflement (102) une agglutination de mitochondries et une fixation sur les noyaux, déjà signalée au chapitre précédent pour les isoléments en solution saline. Dans ces conditions, les mitochondries se sédimentent très facilement, même aux faibles vitesses de centrifugation, où elles se déposent avec les noyaux, et ne peuvent en être séparées par les lavages successifs. Ces liquides de lavage des premiers culots, très pauvres en particules ont un aspect limpide, et une couleur rouge. Cet aspect du liquide surnageant contraste avec celui des solutions centrifugées parallèlement, le surnageant contenant de l'EDTA ayant la teinte la moins rose.

Au cours des premières centrifugations à faible vitesse destinées à éliminer les noyaux, les suspensions en solution de saccharose isotonique seul laissent déposer le moins de mitochondries, l'addition d'EDTA entraînant quelques pertes en ces particules, mais incomparablement plus faibles que l'addition de CaCl_2 . Le complexe paraît donc avoir une influence directe sur la sédimentation, indépendante de son pouvoir complexant vis-à-vis du calcium. Ces résultats ne correspondent pas exactement à ceux obtenus par HOGEBOOM dans l'isolement des noyaux de cellules hépatiques (53) en milieu, il est vrai, plus concentré en saccharose (0,34 M) et beaucoup plus dilué en CaCl_2 (0,00018 M) où la fraction nucléaire renfermait moins de 0,5 p. 100 des mitochondries libres de l'homogénat. A ces très faibles concentrations, le chlorure de calcium n'avait sans doute pas d'effet agglutinant

TABLEAU N° 5

STADE D'ISO- LEMENT	CARACTÉRIS- TIQUES	MILIEU DE SÉPARATION		
		Saccharose 0,25 M EDTA 0,002 M	Saccharose 0,25 M	Saccharose 0,25 M CaCl ₂ 0,004 M
N ₁	Graisses en sur- face.	Abondantes	Abondantes	Rares
	Aspect du surna- geant s ₁ .	Jaune-rose, épais	Rosé, épais	Rouge, assez fluide
	Culot.....	Assez compact	Peu tassé, se remettant aisément en suspension	Très volumineux
N ₂	Graisses en sur- face.	Présentes	Présentes	Absentes
	Aspect du surna- geant s ₂ .	Laiteux, épais	Rose laiteux, épais	Rose limpide
	Culot.....	3 zones de sédimentation distinctes : — Couche rosée peu dense (mitochondries mal sédimentées) ; — Couche jaune crème concentrée (mitochondries fortement sédimentées) ; — Couche brun-rouge avec petit amas de globules très rouges au fond (noyaux, tissu conjonctif, hématies). 	Même aspect que le culot sédimenté en milieu saccharose + EDTA, la zone intermédiaire jaune étant cependant moins tassée, l'amas globulaire au fond du tube un peu plus important et le volume total plus grand.	2 zones de sédimentation. — Couche jaune-crème volumineuse. — Couche brun-rouge avec petit amas de globules très rouges au fond. 
N ₃	Graisses en sur- face.	Quelques traces	Quelques traces	Absentes
	Aspect du surna- geant s ₃ .	Jaune assez limpide	Rose laiteux, épais	Rose limpide
	Culot.....	2 zones de sédimentation compactes : — Couche jaune-crème encore assez importante ; — Couche brun-rouge.	2 zones de sédimentation peu compactes : — Couche jaune-crème plus réduite qu'en présence d'EDTA ; — Couche brun-rouge. Volume total sédimenté plus important qu'en présence d'EDTA.	Importante couche rosée au-dessus du sédiment rouge. Faible trainée de globules rouges au fond du tube. Sédiment très compact et volume total important.
	Teneur en azote (Kjeldahl) du culot remis en suspension.	0,63 mg pour un volume de suspension correspondant à 1 cm ³ d'homogénat initial.	0,55 mg	1,82 mg

TABLEAU n° 6

ADE ISO- MENI	CARACTÉRIS- TIQUES	MILIEU DE SÉPARATION		
		Saccharose 0,25 M EDTA 0,002 M	Saccharose 0,25 M	Saccharose 0,25 M CaCl ₂ 0,004 M
M ₁	Graisses en surface...	Très abondantes	Abondantes	Peu abondantes
	Aspect du surnageant σ ₁ .	Jaune-rosé, opalescent	Rosé opalescent	Rouge limpide
	Culot	Quelques débris rouges sur- montés d'une importante couche brune et d'un lé- ger sédiment rosé.	Analogue au culot obtenu en milieu saccharose + EDTA mais moins com- pact.	Faible culot rosé
M ₂	Graisses en surface...	Rares	Absentes	Absentes
	Aspect du surnageant σ ₂ .	Rosé assez limpide	Rosé opalescent	Incolore, limpide
	Culot	3 zones de sédimentation : — Rosé-crème [mitochon- dries, faiblement sédimen- tées souillées de quelques microsomes. — Jaune brun. — Brun-rouge (mitochon- dries forte- ment sédi- mentées). 	Analogue au culot obtenu en milieu saccharose + EDTA mais d'un volume moins important.	Rose homogène, de faible volume
M ₃	Graisses en surface...	Rares	Absentes	Absentes
	Aspect du surnageant σ ₃ .	Jaune paille très limpide	Jaune paille assez limpide	Absolument incolore et limpide
	Culot	Même aspect qu'au stade précédent. Zone rose-crème importante.	Même aspect qu'au stade précédent. Zone rose-crème réduite.	Rose homogène, de faible volume
	Teneur en Azote (Kjel- dahl) du culot remis en suspension.	0,91 mg pour un volume de suspension correspondant à 1 cm ³ d'homogénat ini- tial.	0,71 mg	0,20 mg
μ	Graisses en surface...	Moyennes	Très abondantes	Très rares
	Culot	Crème	Rosé	Rouge
	Teneur en Azote [Kjel- dahl] du culot remis en suspension.	0,47 mg pour un volume de suspension correspondant à 1 cm ³ d'homogénat ini- tial.	0,78 mg	0,10 mg

sensible sur les mitochondries, ou tout au moins les agrégats formés étaient-ils suffisamment peu importants pour ne pas se sédimenter en solution de saccharose 0,34 M. Si le chlorure de calcium à très faible dose a l'avantage, pour l'isolement des noyaux, d'éviter leur aggrégation et leur altération au cours des lavages, il est néfaste à l'obtention de mitochondries pures : HOGEBOOM signale une forte contamination de la fraction mitochondriale par des particules submicroscopiques.

b. Isolement des mitochondries par centrifugation rapide :

Nous avons également constaté que le culot obtenu par centrifugation rapide des liquides surnageants après les centrifugations lentes, avait dans le cas de la préparation réalisée en milieu chlorure de calcium un aspect tout différent des culots mitochondriaux normaux (obtenus en milieu saccharose isotonique, ou saccharose + EDTA), se rapprochant plutôt des culots microsomaux obtenus dans les deux autres cas. Au contraire, en présence d'EDTA le culot microsomial a une teinte plus jaune que celui obtenu en saccharose seul, se rapprochant ainsi des microsomes isolés par BIRBECK et REID dans leur milieu complexe (14).

Ainsi la sédimentation des mitochondries est favorisée par la présence d'EDTA dans le milieu au cours des centrifugations rapides.

Le milieu de suspension, constitué par une solution de saccharose 0,25 M et d'éthylène-diamine tétraacétate disodique 0,002 M est donc celui qui permet l'obtention du culot mitochondrial le plus important. En plus de la centrifugation différentielle des mitochondries, il peut favoriser leur libération de la cellule, car on a précédemment signalé cette seconde influence du complexon à partir de différents types de cellules [MERKEL (80)].

Observées au microscope électronique, les mitochondries isolées en présence de complexon présentent une structure interne granulaire (planches II à IV) alors que les mitochondries obtenues à partir de suspensions réalisées en saccharose isotonique seul présentent l'aspect de fantômes à peu près vides (planche V). Il semblerait donc que l'EDTA stabilise morphologiquement les mitochondries, comme le pensaient GLIMSTEDT et LAGERSTEDT (37) à la suite d'expériences d'incubation de mitochondries, préalablement isolées en solution de saccharose 0,88 M, dans des milieux de concentration variable en saccharose, ou en électrolyte, renfermant ou non de l'EDTA à la concentration 0,01 M. Si l'aspect général des mitochondries et de leurs membranes en particulier dépendait de la tonicité du milieu employé, les granulations internes ne persistaient qu'en présence de complexon.

B. INFLUENCE DU COMPLEXON SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Comme nous l'indiquions au début de ce chapitre, nous n'avons examiné l'influence du complexon sur la structure des mitochondries qu'après avoir noté son influence notable sur l'activité prolineoxydasique. Pour étudier cette influence, nous avons ici encore isolé des mitochondries simultanément en solutions de saccharose 0,25 M et de saccharose 0,25 M - EDTA 0,002 M à partir d'un même homogénat initial à 10 p. 100, préparé en solution de saccharose 0,25 M.

Si les premières expériences montraient une activité spécifique plus importante en présence d'EDTA, elles n'ont cependant pas été retenues en raison de la dilution plus grande des mitochondries isolées en saccharose seul quand a été démontrée l'influence inhibitrice de cette dilution. Aussi avons-nous refait des séparations parallèles à l'issue desquelles les mitochondries isolées en solution de saccharose pur étaient remises en suspension dans un volume égal seulement aux trois quarts du

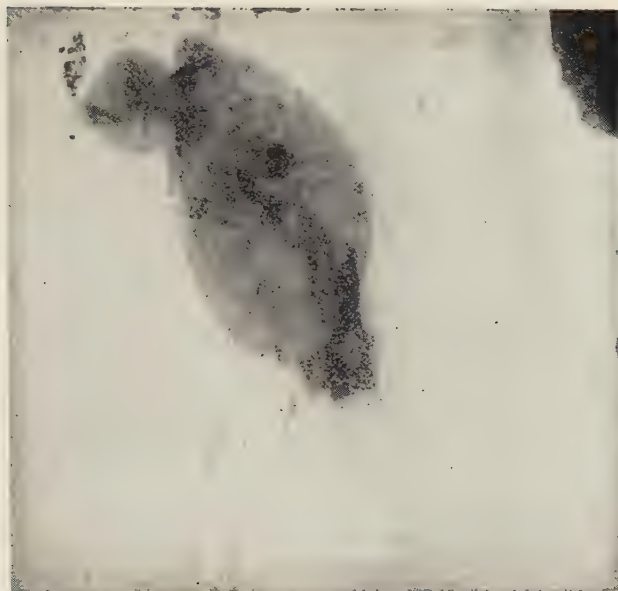


PLANCHE IV

MITOCHONDRIE EN SOLUTION DE SACCHAROSE + EDTA

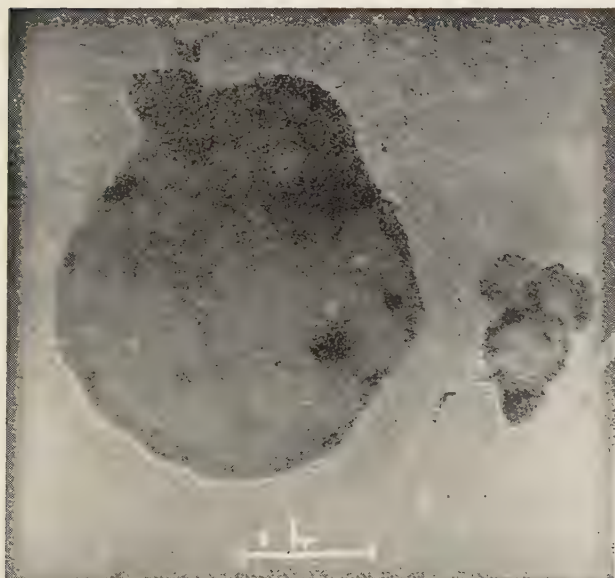


PLANCHE V

MITOCHONDRIE EN SOLUTION DE SACCHAROSE

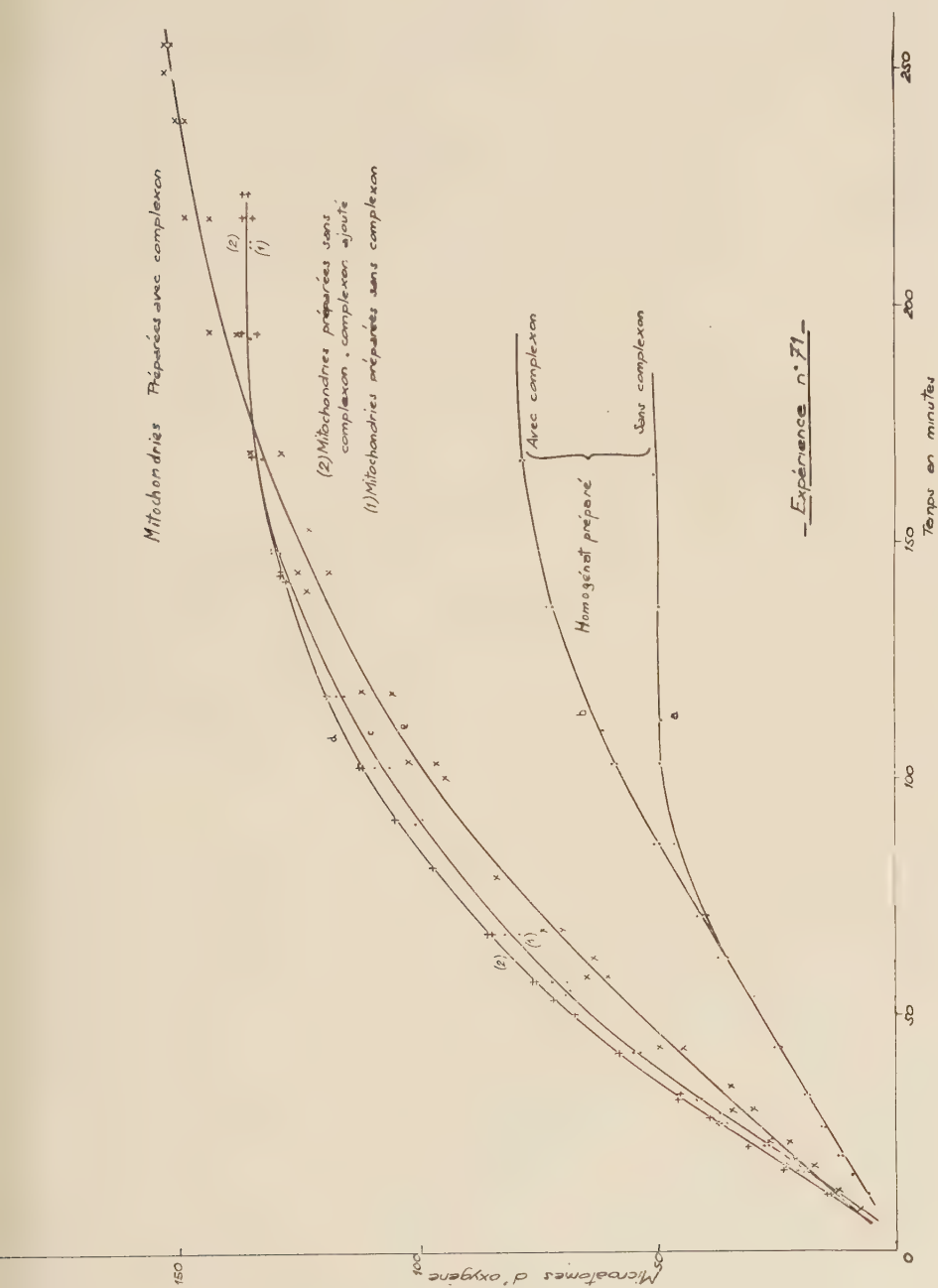


FIG. 8

Influence du complexon sur l'activité prolineoxydasique

Composition du milieu d'incubation :

1 cm³ de préparation enzymatique (homogénat ou mitochondries) en suspension dans la saccharose 0,25 M seul (courbes a, c, d) ou additionné d'EDTA : 2 μ M par cm³ (courbes b, e). SO₄ Mg 8 μ M; KCl 150 μ M; phosphate de sodium pH 7,4 : 60 μ M; AMP 15 μ M; L-proline 30 μ M; EDTA : 3 μ M (courbe c).

Volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau distillée.

volume de la suspension de mitochondries isolées en présence de complexon. Les taux d'azote de ces deux suspensions étaient alors égaux à 3 p. 100 près. Les courbes de la figure 8 traduisent l'influence de l'EDTA sur la prolineoxydase :

L'activité spécifique, exprimée en microatomes d'oxygène consommé par minute, pour 1 milligramme d'azote de la suspension, est de :

- 1° 0,50 pour les mitochondries isolées en solution de saccharose seul;
- 2° 0,56 pour les mitochondries isolées en solution de saccharose seul si l'on ajoute 3 μ mol d'EDTA par fiole de Warburg (concentration finale sensiblement égale à 0,003 M);
- 3° 0,45 pour les mitochondries isolées en solution de saccharose + EDTA.

En comparant les résultats obtenus dans les conditions indiquées en 2° et 3° où la teneur en EDTA du milieu d'oxydation était finalement sensiblement la même, on constate que la présence d'EDTA dans le milieu d'isolement diminue sensiblement l'activité peut-être par une complexation de coenzymes métalliques au cours de la préparation : les particules sont au contact de cet agent complexant pendant plusieurs heures, à basse température certes, mais avec des phases de dispersion accentuée au cours des remises en suspension. Par ailleurs GROSS (43) a montré qu'à des concentrations inférieures à 0,003 M l'EDTA accélère l'activité ATPasique du muscle, qu'il inhibe à des concentrations supérieures.

Mais l'absence d'agent complexant diminue dans des proportions beaucoup plus grandes la *stabilité de la préparation*. L'addition d'EDTA au milieu d'incubation des mitochondries isolées en solution de saccharose pur ne rétablit pas cette stabilité, phénomène également constaté sur des mitochondries d'origine végétale par LIEBERMAN (73) et qui montre que l'altération des mitochondries a lieu très tôt au cours de l'isolement.

Il faut remarquer d'ailleurs que ces résultats sont entachés d'une erreur systématique. Nous avons indiqué à plusieurs reprises que, dans toutes ces expériences comparatives, l'homogénat de départ à 10 p. 100 était réalisé avec une solution de saccharose 0,25 M. Si l'inactivation est due à la fixation sur les mitochondries du calcium cellulaire comme c'est selon SLATER (118) le cas pour les sarcosomes cardiaques au cours de l'homogénéisation initiale du tissu, malgré la basse température à laquelle s'effectue l'opération, une certaine quantité de calcium aura été fixée, qui s'éliminera par la suite difficilement, même en présence d'EDTA. L'action de ce dernier, telle qu'elle se traduit ici dans les différences de comportement des particules au cours des centrifugations ou au cours de l'oxydation de la proline, ne peut donc être qu'inférieure ou au plus égale à l'action qu'il exerce quand on l'ajoute au milieu d'homogénéisation.

On remarquera sur la figure précédente les courbes reflétant l'action de l'EDTA sur l'activité des homogénats : l'incubation à 35 °C de la suspension va favoriser la fixation du calcium intracellulaire sur les particules enzymatiquement actives. Aussi la stabilisation par addition de complexon dès la fin de l'homogénéisation sera-t-elle beaucoup plus importante pour les homogénats que pour les particules qui vont subir des lavages importants comme les mitochondries M_3 .

La relation entre le rôle protecteur de l'EDTA et son pouvoir complexant vis-à-vis du calcium est confirmée par la forte inhibition de l'activité prolineoxydasique par cet ion, inhibition que nous avons précédemment signalée (108) [fig. 9].

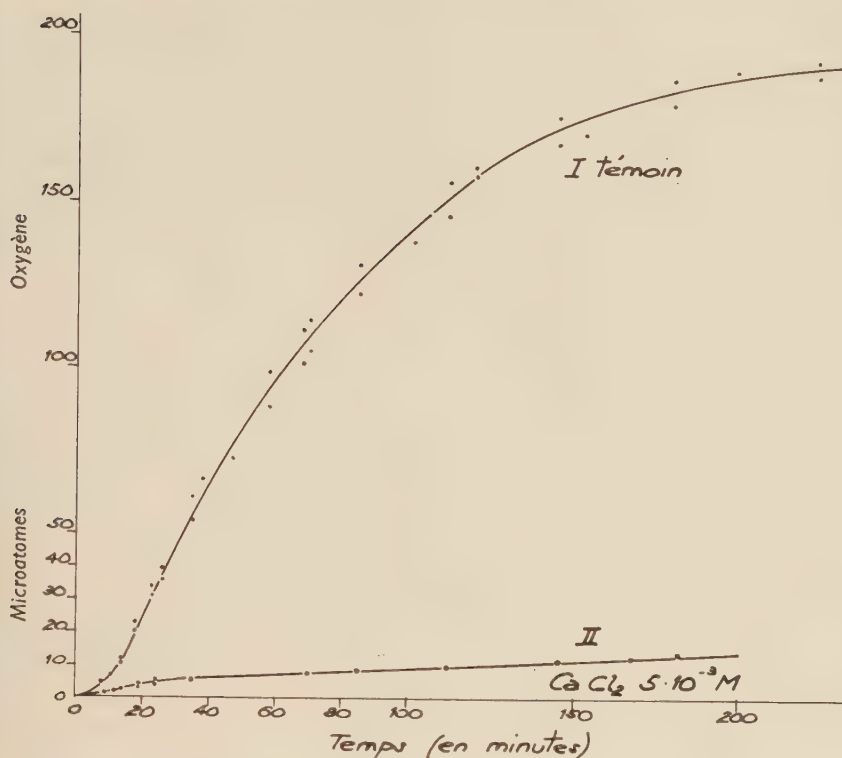


FIG. 9

Influence du calcium sur l'activité prolineoxydasique des mitochondries

Composition du milieu d'incubation :

1 cm³ de suspension mitochondriale en solution de saccharose 0,25 M + EDTA 0,002 M (2 μM).
 SO₄Mg 8 μM; KCl 150 μM; phosphate de sodium pH 7,4, 60 μM; AMP 15 μM; L-proline 60 μM;
 CaCl₂ 15 μM (courbe II seulement).

La consommation d'oxygène des suspensions en l'absence de proline a été déduite de la consommation en présence de substrat pour obtenir les valeurs indiquées.

II. — FACTEURS PHYSIQUES : TEMPÉRATURE ET DURÉE DE PRÉPARATION

En l'absence de substrat, la conservation de l'activité prolineoxydasique des préparations mitochondriales de foie exige une température voisine de 0 °C, malgré la présence d'EDTA dans la suspension, et à la différence des préparations de sarcosomes cardiaques de SLATER (118). L'activité maximum reste intacte quand les mitochondries, sous forme de culot de centrifugation ou de suspension dans le milieu saccharose + EDTA, sont maintenues, même plus de 3 heures, à 0 °C, et cela, quelle que soit la concentration en ester phosphorique du milieu réactionnel (fig. 10 A, B, C). Par contre cette activité maximum est réduite de 50 p. 100 (0,22 au lieu de 0,40 μ At oxygène/mn/mgN) par une incubation de la suspension 10 minutes à 35 °C (fig. 10 D). La baisse de stabilité est encore plus marquée : la

vitesse de consommation d'oxygène est réduite à 50 p. 100 de sa valeur maximum après 35 minutes pour la préparation incubée à 35 °C au lieu de 80 minutes pour la préparation normale.

Parmi les diverses activités enzymatiques des mitochondries, la prolineoxydase se montre beaucoup plus labile que la succinoxydase, dont l'activité maximum reste inaltérée, et la stabilité à peine réduite par les mêmes conditions d'incubation (fig. 10 D). Cette stabilité plus forte n'est pas sans relation avec la localisation de la succinoxydase, seule parmi les autres enzymes intervenant dans le cycle de Krebs, sur la membrane mitochondriale (115). Les stades d'oxydation particulièrement

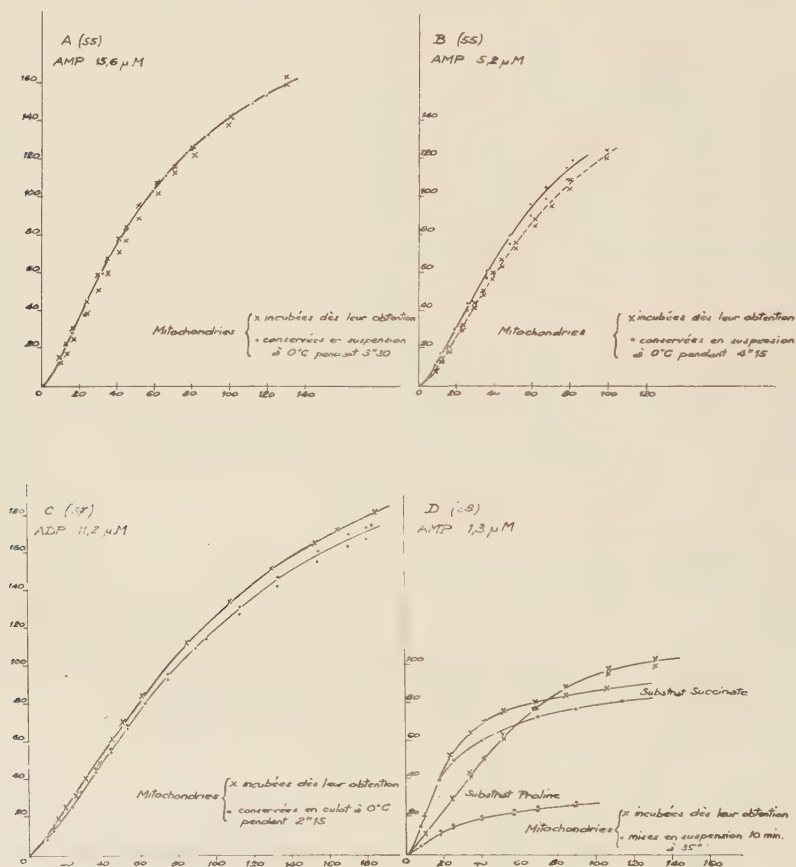


FIG. 10

Influence de la température de conservation des mitochondries isolées sur l'activité prolineoxydasique

Composition du milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale, titrant de 3,0 à 3,4 mg d'azote.

8 μ M de SO₄Mg; 150 μ M de KCl ; 30 μ M de tampon phosphate de sodium pH 7,4; 60 μ M de L (—) proline ou de succinate.

Volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau bidistillée.

Potasse dans le puits central. Atmosphère oxygène. Température 35 °C.

labiles seraient donc antérieurs au succinate, et même à l' α -cétoglutarate si l'on compare nos résultats à ceux de SLATER. D'ailleurs dans les conditions adoptées pour cette expérience, en particulier avec une concentration en acide adénylique de 1,3 μ M par fiole, le rapport de l'oxygène consommé à la proline disparue reste sensiblement égal à 3,5 que les mitochondries aient été au préalable incubées ou non à 35 °C. L'arrêt de l'oxydation paraît donc bien se produire dès le premier stade de transformation de la proline, soit directement, soit par suite de l'accumulation de l'un des premiers composés intermédiaires formés, bloquant immédiatement ce premier stade.

Il faut enfin remarquer que ces préparations, si elles sont très rapidement inactivées par une incubation à 35 °C dans un milieu ne renfermant que du saccharose et de l'éthylène-diamine tétraacétate de sodium présentent, fraîchement utilisées, une activité prolineoxydasique qui se maintient pendant très longtemps, en présence de tous les composants du milieu d'oxydation. (Dans des conditions optima, la consommation d'oxygène s'est poursuivie pendant près de six heures, ne s'arrêtant qu'après disparition entière de la proline). Cette influence néfaste de la température en l'absence de substrat confirme la nécessité, déjà signalée, de procéder à l'équilibrage des températures avant le début des mesures manométriques, en présence de tous les composants de la réaction.

En conclusion, l'addition d'éthylène-diamine tétraacétate disodique (EDTA) à la concentration 0,002 M à une solution de saccharose 0,25 M améliore nettement le milieu d'isolement de la prolineoxydase mitochondriale. A ces très faibles concentrations, l'EDTA a non seulement un effet stabilisateur sur l'activité enzymatique que peuvent expliquer le pouvoir complexant vis-à-vis du calcium démontré par SLATER (118) et la protection des structures mitochondriales (33) (37), mais favorise également la sédimentation des particules. Les expériences que nous venons de rapporter, effectuées dans des conditions strictement comparatives, mettent en évidence l'avantage du milieu saccharose-EDTA sur les solutions de saccharose pur pour la séparation des mitochondries par centrifugation fractionnée d'homogénats cellulaires de foie de rat. Ils apparentent ce milieu à ceux, plus complexes définis ces dernières années, mais dont certains constituants présentaient des inconvénients pour cette étude soit qu'ils interfèrent avec la réaction d'oxydation de la proline [citrate (141), AMP (14)], soit que leur teneur en azote (88) complique la détermination de la répartition de l'azote tissulaire dans les différentes fractions, et de l'activité spécifique de chacune d'elles. Sous réserve des conditions de rapidité, de température et de technique d'homogénéisation précédemment définies, ce milieu permet d'obtenir des préparations mitochondriales présentant une activité prolineoxydasique supérieure à celles étudiées jusqu'à ce jour.

CHAPITRE IV

FACTEURS DE L'OXYDATION DE LA L-PROLINE
PAR LES MITOCHONDRIES

Nous avons montré que la prolineoxydase hépatique se localisait au niveau des mitochondries. La conservation de l'activité enzymatique des particules isolées dépend du mode de séparation des différents constituants cellulaires, et nous venons de définir un ensemble de conditions susceptibles de fournir des corpuscules encore actifs à l'issue des fractionnements. Mais l'importance de cette activité sera évidemment conditionnée par le milieu dans lequel se déroulera la réaction d'oxydation elle-même.

Or, ces conditions de milieu n'ont pas été précisées dans les études antérieures, et peuvent d'ailleurs dépendre du matériel utilisé. Ainsi LANG et SCHMID (64) faisaient simplement incuber leur préparation de foie de chien avec de la proline, en présence d'une solution tampon de phosphate de pH 8 et à 37 °C en flacon ouvert. TAGGART et KRAKAUR (126) ont montré la nécessité, pour une vitesse maximum d'oxydation de la proline par la cyclophorase de foie, ou surtout de rein de lapin, de la présence d'AMP ou d'ATP, d'ions magnésium et de phosphate minéral, ainsi que d'un excès de substrat. Le milieu réactionnel était ainsi qualitativement mieux défini, mais rien n'indiquait que les concentrations auxquelles ces auteurs utilisaient les constituants ci-dessus réalisent l'activité optimum : d'ailleurs ils notaient des exigences variables de leur système cyclophorase, augmentant avec le temps. Le pH du milieu n'était pas exactement défini, mais était de l'ordre de 7,3, valeur du pH de la solution tampon de phosphate de potassium utilisée. La température de 38 °C avait été choisie dans les premières études sur la cyclophorase (42).

Aussi avons-nous entrepris de déterminer l'influence exacte de ces différents constituants, ainsi que d'autres tels que la concentration en enzyme, afin de pouvoir étudier l'oxydation de la L-proline par les mitochondries hépatiques du rat dans les conditions optima. L'influence de la concentration du substrat, étant liée directement au mécanisme de l'action enzymatique sera examinée dans la deuxième partie de ce travail.

I. — TEMPÉRATURE OPTIMUM D'ACTIVITÉ

En raison des variations d'activité inévitables d'une expérience à l'autre, les mesures manométriques de consommation d'oxygène ont été effectuées simultanément, avec la même suspension mitochondriale dans trois thermostats réglés à des températures différentes. Les deux séries d'expériences effectuées sont représentées par les familles de courbes A et B de la figure 11. Bien que la concentration de la suspension soit sensiblement la même dans les deux préparations (4,15-4,21 mg d'azote Kjeldahl par cm³ contre 4,15-4,23 pour la deuxième préparation) on observe

à des températures égales, une différence d'activité significative. Le tableau n° 7 résume les résultats de ces expériences.

TABLEAU n° 7

Influence de la température de réaction sur l'activité prolineoxydasique

TEMPÉRATURE °C	N° EXPÉR.ENCE	ACTIVITÉ MAXIMUM $\mu\text{At O}/\text{mn}$	CONSOMMATION TOTALE d'oxygène μAt	CONSOMMATION DE PROLINE μMol
30.....	64	1,9	280	60
33.....	65	2,2	307	59
35.....	64	2,3	260	//
35.....	65	2,6	325	59
37.....	65	2,6	325	59
40.....	64	1,9	260	58

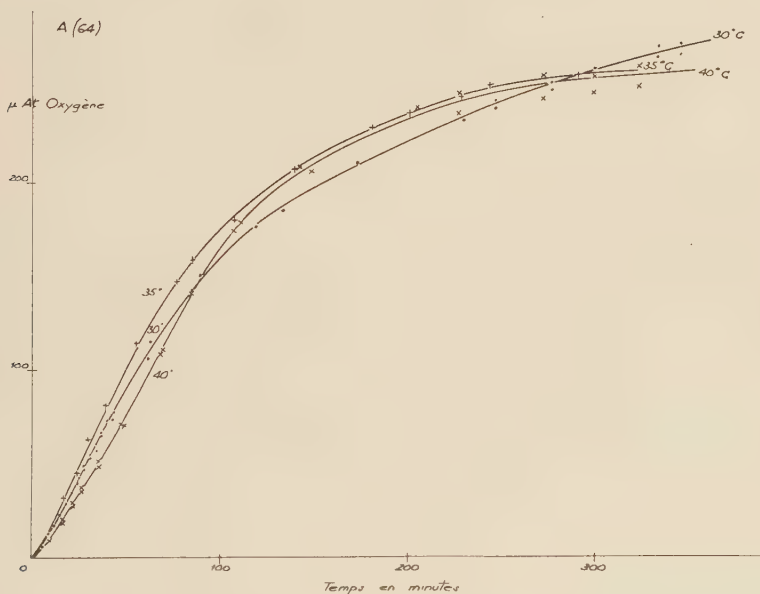


FIG. 11 A

Influence de la température sur l'activité prolineoxydasique

Expérience 64 :

Composition du milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale dans une solution de saccharose - EDTA.

SO₄Mg 8 μM; KCl 150 μM; AMP 15,7 μM.

Tampon phosphate de sodium pH 7,4 : 60 μM; Proline : 60 μM.

Volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau bidistillée.

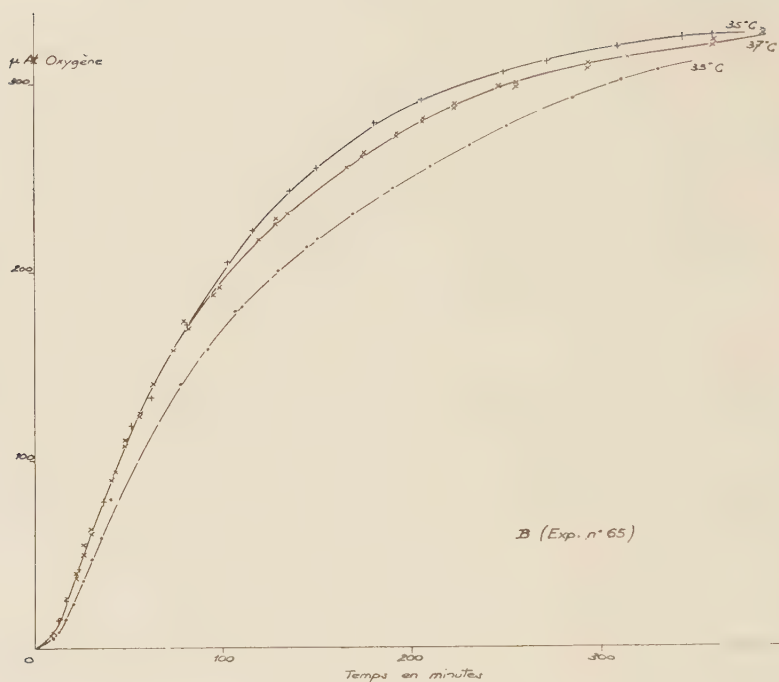


FIG 11 B.

Influence de la température sur l'activité prolineoxydasique

Expérience 65 :

Même milieu que pour l'expérience 64.

La consommation de proline a donc été totale dans tous les cas, et l'activité maximum se situe entre les températures de 35 °C et 37 °C dans les deux séries d'expériences. La comparaison des différentes courbes montre que la température n'influe pratiquement pas sur la stabilité de la préparation tout au moins entre les valeurs extrêmes considérées ici. Ce phénomène est d'autant plus remarquable pour des expériences se prolongeant plusieurs heures, que l'on a précédemment signalé l'inactivation rapide du système prolineoxydasique à 35 °C en l'absence de substrat.

II. — pH OPTIMUM D'ACTIVITÉ

En général les variations de pH exercent leur influence sur l'activité enzymatique par ionisation du substrat et des groupes actifs de l'enzyme. Mais dans le cas présent, elles ont un effet supplémentaire direct sur la structure mitochondriale, en particulier sur la membrane (106). Seront ainsi modifiées la perméabilité des mitochondries aux divers substrats et leur stabilité propre. Aussi convient-il d'examiner l'influence exacte des variations de pH sur la prolineoxydase.

La composition de la solution tampon de phosphate présente dans le milieu d'incubation des mitochondries permet de faire varier le pH de ce milieu. La solution tampon est réalisée par un mélange de solutions 0,2 moléculaires de

phosphates mono, di, et trisodiques. Mais nous avons précédemment indiqué que les mitochondries modifient notablement le pH de la solution de saccharose et d'EDTA dans laquelle elles sont mises en suspension. Ces suspensions mitochondriales présentent par elles-mêmes un pouvoir tampon important, qui va considérablement amortir les variations de pH auxquelles on pouvait s'attendre à la suite de l'addition de divers tampons de phosphate. (Il est à noter que le pH du milieu réactionnel complet, comprenant les mitochondries, est constant au cours de l'incubation, comme le montrent les résultats des mesures rassemblés dans le tableau n° 8.)

TABLEAU n° 8

Valeur du pH du milieu en fonction des différents tampons

COMPOSITION DU TAMPON EN CM ³ DE SOLUTIONS 0,2 M DE :			pH DU TAMPON	pH DU MILIEU avant incubation	pH DU MILIEU APRÈS INCUBATION	
PO ₄ H ₂ Na	PO ₄ HNa ₂	PO ₄ Na ₃			Avec proline	Sans proline
99	1	—	4,7	5,8	5,8	5,8
50	50	—	6,7	6,7	6,7	6,7
18	82	—	7,4	7,0	7,1	7,0
6	94	—	7,9	7,3	7,3	7,3
—	90	10	10,3	7,7	7,7	7,7
—	75	25	10,9	8,0	7,9	7,9
—	10	90	11,2	9,2	9,1	9,1

Les résultats des expériences ont été rassemblés dans le tableau n° 9, la concentration des suspensions utilisées étant la suivante :

Exemple n° 63, 4,8 mg d'azote Kjeldahl par cm³;

Exemple n° 64, 4,2 mg d'azote Kjeldahl par cm³;

Exemple n° 65, 4,2 mg d'azote Kjeldahl par cm³.

La figure n° 12 traduit les résultats contenus dans ce tableau, concernant l'influence du pH sur l'activité spécifique maximum. Si l'on observe des variations parfois assez importantes pour une même valeur du pH entre l'activité des différentes préparations, dans les trois cas, à l'intérieur d'une même série, le pH d'activité optimum se situe entre 7,1 et 7,7. La chute d'activité brutale pour des valeurs de pH supérieures à 8 est sans doute liée à la formation d'hydroxydes peu dissociés, soit avec les ions magnésium ajoutés au milieu, soit avec les métaux associés aux coenzymes intervenant dans la réaction. Par ailleurs la structure des mitochondries est fortement altérée en milieu alcalin, et la suspension se dépose rapidement dans les fioles de Warburg.

Dans une zone de pH assez étendue (au moins de 6,1 à 8,0) toute la proline présente est oxydée, le quotient d'oxydation $\frac{\text{oxygène consommé}}{\text{proline disparue}}$ variant avec les préparations entre 4,3 et 5,5 d'une manière plus importante que, pour une même préparation, avec les variations de pH.

TABLEAU N° 9

Influence du pH du milieu sur la prolineoxydase

pH DU MILIEU	N° EXPÉRIENCE	Q _{O₂} MAXIMUM (μ At oxygène/ mg N)	CONSUMMATION TOTALE d'oxygène μ At	PROLINE OXYDÉE μ M
5,8.....	63	0,19	78	17
6,1.....	64	0,33	138	//
6,7.....	65	0,47	250	58
7,0.....	63	0,52	330	59
	64	0,56	268	//
	65	0,56	325	59
7,3.....	65	0,57	325	59
7,7.....	63	0,52	313	59
	65	0,56	290	59
8,0.....	64	0,47	220	//
	65	0,54	235	58
9,2.....	64	0	3	5

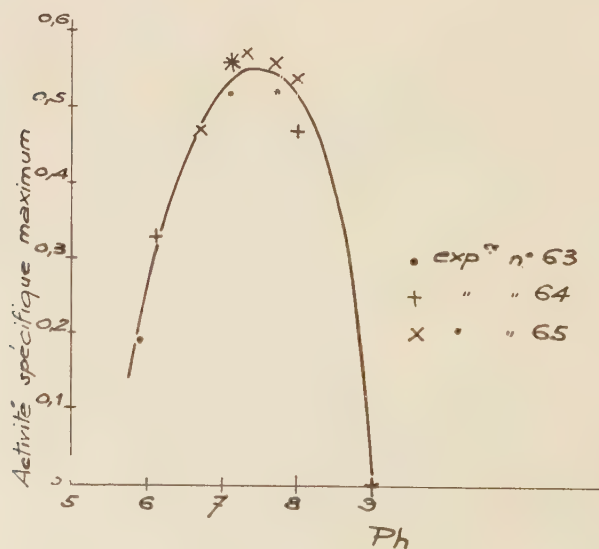


FIG. 12

Influence du pH sur l'activité spécifique maximum

III. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN TISSU

La concentration en tissu, exprimée par le taux d'azote total, mesuré par la méthode de Kjeldahl, par centimètre cube de suspension, varie sensiblement d'une préparation à l'autre. Le temps nécessaire à une détermination ne permet pas d'ajuster la dilution de la préparation à une valeur donnée. Aussi a-t-on choisi, pour représenter l'activité de la préparation, la vitesse maximum de consommation d'oxygène, exprimée en micro-atomes par minute et par milligramme d'azote. Mais il convenait de vérifier si, comme dans le cas général, la consommation d'oxygène était bien proportionnelle à la quantité de tissu. Pour cela, dans deux expériences, une partie de la suspension de mitochondries, telle qu'elle est préparée à l'issue de la série de centrifugations — 1 cm³ de suspension renfermant les mitochondries provenant de 4 cm³ d'homogénat de foie — est diluée respectivement deux et quatre fois par une solution de saccharose 0,25 M + EDTA 0,002 M — solution identique à celle utilisée comme milieu de centrifugation.

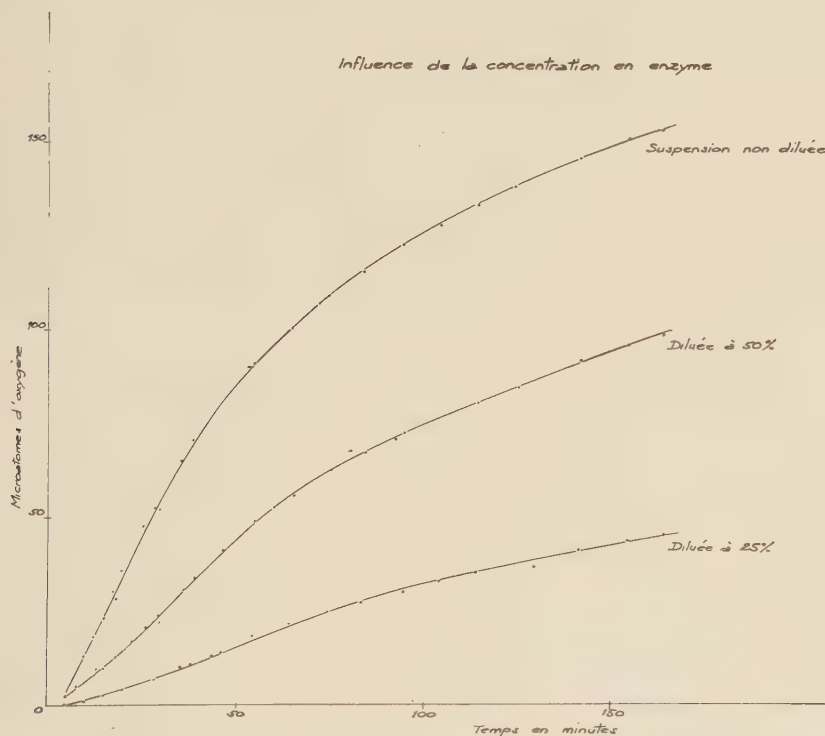


FIG. 13

Influence de la dilution de la suspension mitochondriale sur l'activité prolineoxydasique

Composition du milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale dans une solution de saccharose-EDTA.

SO₄Mg : 8 μM, KCl : 150 μM, AMP : 15,7 μM.

Tampon phosphate de sodium pH 7,4 : 60 μM, Proline : 60 μM.

Volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau bidistillée.

On constate alors que la dilution entraîne une légère diminution de l'activité (fig. 13 et 14).

Pour autant que soit légitime l'extrapolation à l'origine des courbes d'activité en fonction de la concentration en tissu, toute respiration disparaîtrait si cette concentration devenait inférieure à 0,4 milligramme d'azote par fiole de Warburg. Le même effet se retrouve dans les suspensions de noyaux, dont on a précédemment attribué la faible activité résiduelle aux mitochondries restant dans cette fraction.

Dans ces conditions, cette influence de la concentration en tissu ne paraît pas liée à l'apport de cofacteurs de la réaction, les différentes fractions cellulaires ne

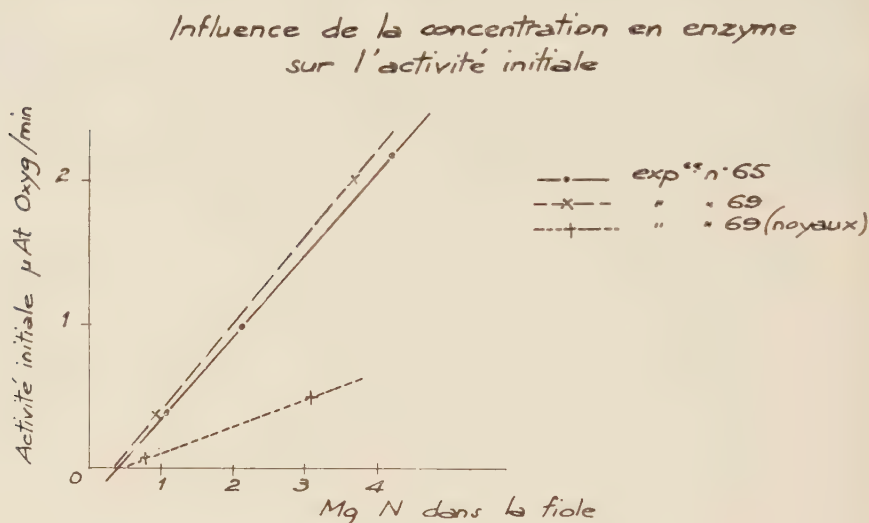


FIG. 14

Influence de la concentration en enzyme sur l'activité initiale

Composition du milieu : voir légende de la figure 13

pouvant contribuer de façon équivalente à cet apport, non plus qu'à la fixation par les protéines tissulaires de certains inhibiteurs de la réaction. Si LE PAGE (71) attribuait l'effet analogue qu'il observait, aux impuretés apportées par l'ATP, l'AMP utilisé dans notre milieu réactionnel ne semble pas responsable de cette inhibition car la respiration de la préparation mitochondriale ne diminue pas quand on augmente la concentration en AMP. Tout au plus verrons-nous ultérieurement qu'un palier d'activité est atteint à partir de 10 micromolécules d'AMP par fiole de Warburg alors que les préparations impures d'ATP utilisées par LE PAGE inhibaient la respiration des homogénats dès la concentration de 3 micromolécules par fiole.

Le cas rencontré ici se rapprocherait plutôt de celui signalé par POTTER dans l'étude de l'Adénosine-triphosphatase (101) : l'auteur y attribuait le manque de proportionnalité entre l'activité et la concentration en tissu à un retard dans le développement de l'activité ATPasique, retard qu'abrégieraient des teneurs plus élevées en tissus. Le rôle possible de l'Adénosine-triphosphatase comme facteur de l'activité prolineoxydasique que nous examinerons ultérieurement établirait

un lien entre le phénomène que nous avons observé et celui signalé par POTTER.

Si nous avons tenu à signaler cette action de la dilution, elle reste cependant suffisamment faible pour que l'activité rapportée à la teneur en azote de la préparation garde un sens autour de la valeur moyenne de 4 milligrammes.

IV. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PHOSPHATE MINÉRAL

Au cours de l'étude de l'influence du pH du milieu sur l'activité proline-oxydasique des mitochondries hépatiques, nous avons eu recours, comme milieu tampon, à des solutions de phosphate de sodium de concentration 0,2 molaire. Ces solutions permettent d'explorer une échelle de pH assez étendue, sans introduire une consommation d'oxygène parasite, due à une oxydation des tampons par les mitochondries. Il importait cependant d'examiner les effets secondaires possibles des ions phosphate sur l'oxydation de la proline, et pour ce, soit de faire varier la concentration des solutions de phosphates ajoutées au milieu d'incubation, soit de réaliser le même pH avec d'autres tampons, pour suivre le comportement des mitochondries en l'absence d'ions phosphate, ou en présence d'une quantité de ces ions insuffisante pour tamponner le milieu.

Deux séries d'expériences ont été réalisées, l'une en présence de glycyl-glycine, l'autre de véronal [tampon de Michaelis de pH 7,4] (56) fixant le pH du milieu à une valeur de 6,7. Cette valeur a été reconnue par la suite comme sous-optimale, mais nous n'avons pas eu la possibilité, en raison du grand nombre de facteurs mis en jeu, d'examiner toutes les combinaisons concevables des différents facteurs. La différence d'activité entre les milieux de pH optimum (7,4) et de pH 6,7 n'étant pas considérable, les résultats obtenus dans ce dernier cas nous ont semblé transposables au cas optimum. Ces résultats sont consignés dans le tableau n° 10.

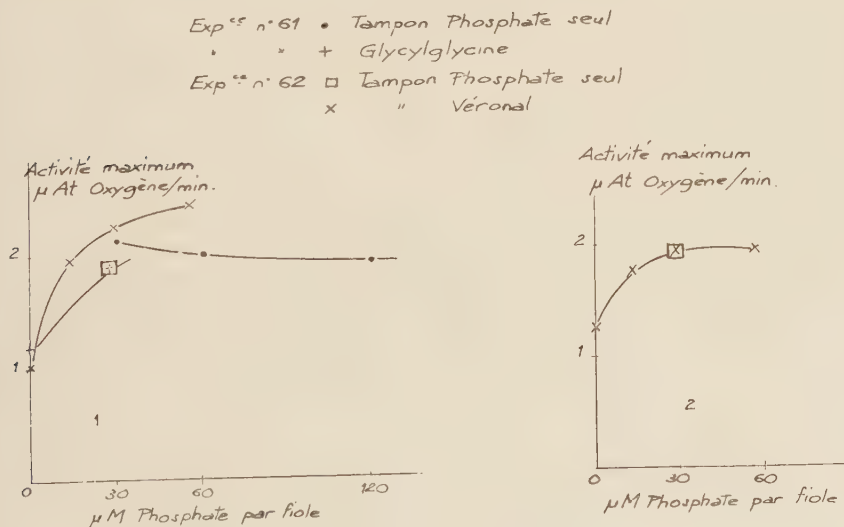


FIG. 15

Influence de la concentration en ions phosphate sur l'activité prolineoxydasique des mitochondries
 1° En présence d'AMP. — 2° En présence d'ATP.

TABLEAU N° 10

Influence de la concentration en phosphate minéral sur l'activité prolineoxydasique

EXPÉRIENCE N°	ESTER PHOSPHORIQUE	TAMPON	ACTIVITÉ MAXIMUM $\mu\text{At } 0/\text{mn}$	CONSOMMATION TOTALE		$\frac{\text{O}_2}{\text{Prot.}}$	STABILITÉ (TEMPS AU SOUT D'UNE $V. < 0,40$)
				D'OXYGÈNE	DE PROLINE		
61	μM AMP 15,7	Phosphate de Na, pH 7,4.....	2,1	μAt	μM		min
		— — — — —	2	270	56	4,9	220
		— — — — —	1,9	298	59	5	240
		Glycylglycine	1,1	298	59	5	> 250
		Glycylglycine.. 30 μM + Phosphate.	1,9	125	46	2,7	130
62	AMP 15,7	Phosphate.....	1,9	300	57	5,2	220
		Véronal.....	1,0	285			
		Véronal..... + Phosphate.	1,9	140	35	4	280
		— — — — —	2,2	250	49	5,2	160
		— — — — —	2,4	310	57	5,5	180
62	ATP 7,9	Phosphate.....	1,9	330	59	5,5	250
		Véronal.....	1,3				280
		Véronal..... + Phosphate.	1,8	265	48	5,5	> 280
		— — — — —	1,9	120	24	5,1	120
		— — — — —	1,9	215	40	5,4	260
62		— — — — —	1,9	255	52	5,2	260
		— — — — —	1,9	295	58	5,1	> 280

La présence d'ions phosphate paraît donc nécessaire à l'activité proline oxydasique maximum de nos préparations, l'absence de ces ions se traduisant par une réduction importante de la vitesse de consommation d'oxygène (fig. 15) de la quantité totale d'oxygène consommé (fig. 16) et de proline transformée, ainsi que de la stabilité des préparations (tableau n° 10). L'oxydation de la proline est également moins complète en l'absence de phosphate minéral.

Ces effets sont plus réduits en présence d'ATP, malgré la pureté du produit utilisé (ATP de potassium cristallisé de fabrication PABST) ne contenant à l'origine que des traces de phosphate minéral. Mais nous verrons ultérieurement qu'il apparaît au cours de l'incubation dans les mitochondries isolées une activité ATPasique non négligeable. Le phosphate minéral ainsi libéré de l'ATP permet une activité plus grande qu'en présence d'AMP. Cette formation de phosphate minéral est cependant insuffisante pour maintenir longtemps l'activité, et la quantité totale d'oxygène absorbé, ainsi que la durée de la réaction restent réduites.

Le rôle du phosphate dans le milieu réactionnel est lié, comme nous le verrons par la suite, aux phosphorylations qui accompagnent l'oxydation de la proline et doit être rapproché du rôle du phosphate minéral intracellulaire dans la régulation de la respiration cellulaire (65) (68). On peut retenir dès maintenant, pour le choix des milieux d'incubation, que l'activité prolineoxydasique est optimum si les fioles d'expérience contiennent pour 1 centimètre cube de suspension mitochondriale, entre 30 et 60 micromolécules de phosphate.

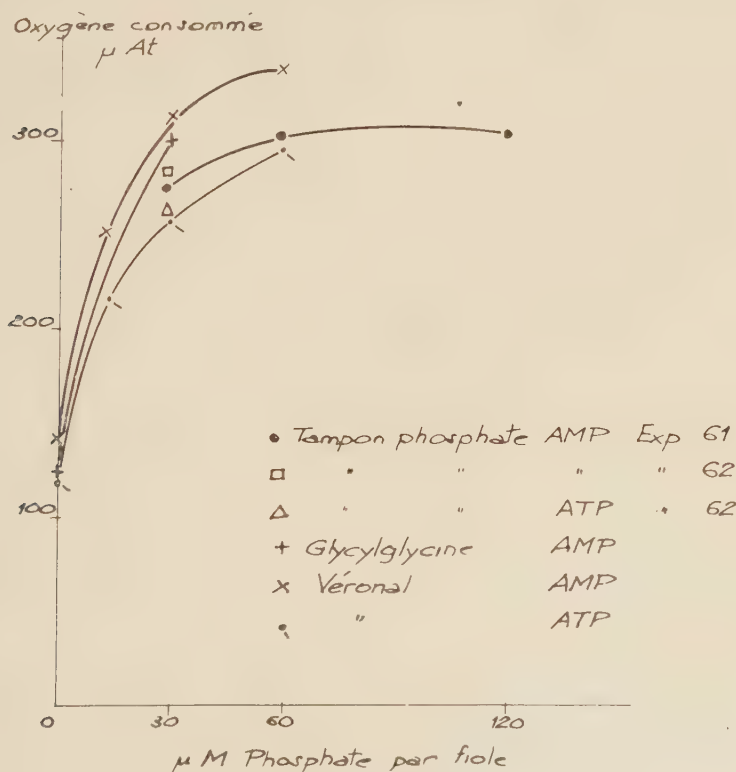


FIG. 16

Influence de la concentration en phosphate sur la consommation totale d'oxygène des mitochondries en présence de proline

V. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ESTERS PHOSPHORIQUES DE L'ADÉNOSINE

a. INFLUENCE DE L'ACIDE ADÉNYLIQUE (AMP)

Les phosphorylations que nous venons de mentionner pour expliquer la nécessité de phosphate minéral dans le milieu réactionnel vont exiger également la présence d'accepteurs de radicaux phosphate. L'acide adénylique (acide adénosine-5-phosphorique), dont LARDY (68) avait signalé l'efficacité particulière à promouvoir l'oxydation du glutamate par les mitochondries, a permis d'enregistrer, à des concentrations convenables, une activité prolineoxydasique importante de ces particules. Le tableau 11 traduit l'influence de ces concentrations sur les différentes caractéristiques des réactions d'oxydation de la proline.

TABLEAU N° 11

Influence de la concentration en AMP sur l'activité prolineoxydasique

EXPÉRIENCE N°	AMP $\mu\text{M}/\text{FIOLE}$	ACTIVITÉ MAXIMUM $\mu\text{At O}/\text{mn}$	CONSOMMATION TOTALE		Ox. Prol.	STABILITÉ (TEMPS au bout duquel $V < 0,40$) mn
			OXYGÈNE μAt	PROLINE μM		
55.....	5,2	1,7	160	42	3,8	145
	10,4	2,7	210	48	4,3	175
	15,6	2,2	240	55	4,3	210
56.....	0	0,65	25	10	2,5	30
	1,3	1,15	140	35	4	155
	2,6	1,35	150	35	4,3	150
	5,2	1,60	165	38	4,4	155
57.....	0	0,55	21	7,5	2,8	25
	0,26	0,90	36	15	2,4	37
	1,3	1,4	160	32,5	4,8	170
60.....	0,84	1,05	98	26	3,8	105
	1,12	1,05	103	29	3,6	110
	15,6	1,7	236	53	4,4	225
	31,2	1,6	239	55	4,4	235

En raison des variations sensibles de l'activité spécifique maximum d'une préparation mitochondriale à une autre, il importe de comparer les résultats d'une même expérience. Dans ces conditions, l'activité maximum croît avec la teneur du milieu en AMP, pour atteindre une valeur maximum pour une teneur de 15 micromolécules par fiole de Warburg, c'est-à-dire pour 1 centimètre cube de suspension mitochondriale.

Il semble (fig. 17) qu'aux faibles concentrations, l'activité spécifique maximum soit sensiblement proportionnelle à la racine carrée de la concentration en AMP.

Les quantités de proline oxydée, et d'oxygène consommé au total ainsi que la stabilité de l'activité mitochondriale sont, comme l'activité maximum, des fonctions croissantes de la teneur du milieu en AMP. La stabilité de l'activité est repérée par le temps pendant lequel la vitesse de consommation d'oxygène est supérieure à 0,4 microatome d'oxygène par minute, valeur arbitrairement choisie mais qui est inférieure aux plus faibles activités maxima mesurées, et supérieure à la vitesse à laquelle se stabilise parfois pour une certaine période la consommation d'oxygène vers la fin de l'expérience. Les valeurs figurant dans la colonne 7 du tableau 11 ne sont donc que des repères de la stabilité de l'activité enzymatique. Mais ces repères

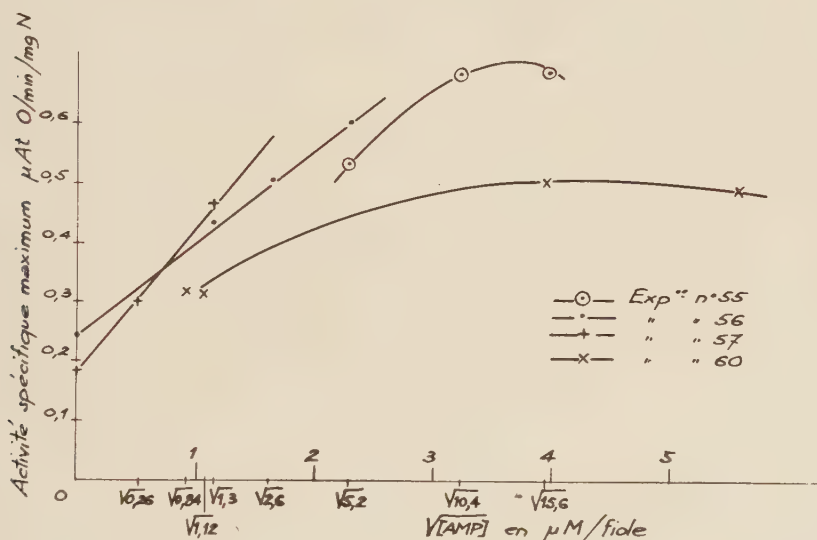


FIG. 17

Influence de la concentration en AMP sur l'activité spécifique maximum

indiquent une augmentation de stabilité importante à partir de l'addition au milieu de 1 micromolécule d'AMP.

La concentration en AMP choisie assure donc une activité prolineoxydasique des mitochondries isolées des cellules hépatiques du rat optimum à tous les points de vue, et une stabilité dans le temps maximum pour cette activité, ce qui répond au problème envisagé dans ce chapitre. Mais il était intéressant de comparer à l'influence de l'acide adénylique celle des acides adénosine di- et triphosphoriques.

b. INFLUENCE DE L'ACIDE ADÉNOSINE-DIPHOSPHATE (ADP)

L'ADP utilisé provenait d'un sel de baryum (fourni par la firme Light) décomposé par le sulfate de sodium. Le titre des solutions était déterminé par dosage du phosphore libéré par une hydrolyse de 7 minutes dans l'acide chlorhydrique normal à l'ébullition.

TABLEAU N° 12

Influence de la concentration en ADP sur l'activité prolineoxydasique

EXPÉRIENCE N°	ADP $\mu\text{M}/\text{FIOLE}$	ACTIVITÉ MAXIMUM $\mu\text{At O}/\text{min}$	CONSOMMATION TOTALE		$\frac{\text{Ox.}}{\text{Prol.}}$	STABILITÉ (TEMPS au bout duquel $V < 0,40$) mn
			OXYGÈNE μAt	PROLINE μM		
57.....	0	0,55	20	10	2,0	25
	1,1	1,3	160	35	4,5	150
	11,2	1,4	210	48	4,3	200
58.....	0	0,85	35	13	2,7	30
	0,27	1,0	45	17	2,7	40
	0,54	1,25	65	20	3,2	55
78.....	0	0,8	25	11	2,3	25
	0,28	0,9	30	9	3,2	30
	0,56	0,95	35	15	2,4	35
	1,45	1	40	14	2,8	45
	4,3	1,3	140	35	4	130
	9,6	1,1	> 180	42	4,3	210
	19,2	0,65	> 90	24	3,8	130

Du tableau ci-dessus, il ressort que la variation de l'activité maximum, quand augmente la concentration en ADP, est nettement moins rapide que lors d'une augmentation équivalente de la teneur en AMP. L'activité maximum, qui semble être aux faibles concentrations une fonction linéaire du taux d'ADP dans le milieu présente, aux fortes concentrations, un maximum beaucoup plus accusé que dans le cas de l'AMP, vers 5 micromolécules par fiole, soit à une concentration aux environs de 2 millimolaire. Cette décroissance nette d'activité aux fortes concentrations (exp. 78) ne semble pas provenir de la qualité du nucléotide, puisque, dans une expérience commune (n° 57) à des concentrations voisines en AMP (1,3 $\mu\text{M}/\text{fiole}$) et ADP (1,1 μM) les activités maxima se sont montrées très proches (1,4 et 1,3 microatomes d'oxygène par minute).

Les autres caractéristiques de la réaction d'oxydation de la proline en présence d'ADP appellent sensiblement les mêmes remarques que pour les réactions réalisées en présence d'AMP. Mais l'augmentation de la stabilité de l'activité mitochondriale dans le temps avec la concentration en ADP, présente un maximum vers 10 micromolécules d'ADP par fiole, maximum non observé dans le cas de l'AMP, dans la même échelle de concentrations. De même l'accroissement de la quantité de proline oxydée et du rapport de l'oxygène consommé à la proline disparue sont assez peu nettes aux faibles teneurs en ADP.

Il semble donc que l'ADP, bien qu'étant un accepteur de phosphate minéral théoriquement plus satisfaisant que l'AMP, convienne moins bien que ce dernier à l'oxydation de la proline par les mitochondries hépatiques.

Contrairement à l'opinion d'OCHOA (91) et de SLATER (116) l'ADP ne serait

pas toujours le meilleur accepteur de phosphate du système adénylique, surtout en présence de la forte activité myokinase des mitochondries (57), et la supériorité de l'AMP sur l'ADP a déjà été signalée dans certaines phosphorylations oxydatives (56).

c. INFLUENCE DE L'ACIDE ADÉNOSINE-TRIPHOSPHATE (ATP)

L'ATP au contraire donne des résultats voisins de ceux de l'AMP : l'activité maximum augmente rapidement avec la concentration en nucléotide, pour présenter un maximum vers 15 micromolécules (l'ester utilisé dans ces expériences est un adénosine-triphosphate de potassium fourni par PABST, et le titre des solutions obtenues directement dans l'eau, est déterminé par dosage du phosphore labile).

Le tableau suivant donne les caractéristiques des réactions d'oxydation de la proline en présence d'ATP.

TABLEAU N° 13

Influence de la concentration en ATP sur l'activité prolineoxydasique

EXPÉRIENCE N°	ATP $\mu\text{M}/\text{FIOLE}$	ACTIVITÉ MAXIMUM $\mu\text{At O}/\text{mn}$	CONSOMMATION TOTALE		Ox. Prol.	STABILITÉ (TEMPS au bout duquel $V < 0,40$) mn
			OXYGÈNE μAt	PROLINE μM		
60.....	0,56	1,05	48	17	2,8	45
	0,84	1,2	68	25	2,7	65
	1,12	1,2	95	28	3,3	90
	15	1,75	> 230	49	4,7	175
	30	1,6	> 215	52	4,2	180
79.....	0	0,55	23	9	2,5	25
	0,3	1,05	52	20	2,6	50
	0,5	1,10	77	24	3,2	70
	0,9	1,15	110	28	3,9	110
	5,7	1,65	> 240	56	4,3	240
	16	1,5	> 240	55	4,3	235
	32	1,2	> 190	50	3,9	235

VI. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CATIONS MINÉRAUX

Les exigences du système prolineoxydasique en dérivés adényliques qui viennent d'être examinées dans le détail, appelaient une étude des besoins en ions magnésium de ce système : en effet on a signalé depuis longtemps la nécessité de tels ions dans les phosphorylations oxydatives liées au système adénylique qui s'expliquerait par leur rôle dans l'activation de la myokinase et de l'ATPase (56) (101).

Nous avons constaté l'existence pour l'oxydation de la proline d'une concentration optimum du milieu d'incubation des mitochondries hépatiques en ces ions, introduits sous forme de chlorure de magnésium et les courbes de la figure 18 montrent leur influence sur la consommation d'oxygène. L'activité est maximum pour environ 10 micromolécules de chlorure de magnésium par fiole, soit 3,5 milli-iongramme par litre de milieu d'incubation (tableau n° 14 et fig. 19).

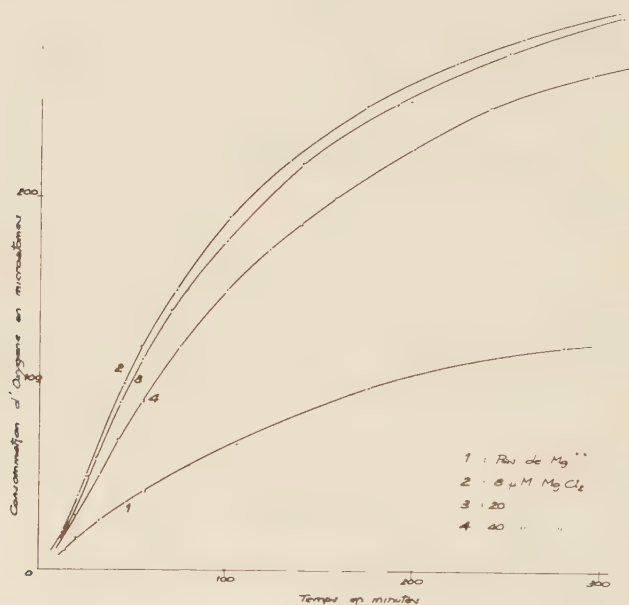


FIG. 18

Activité prolineoxydasique en fonction du temps suivant la teneur du milieu en magnésium

TABLEAU N° 14

Influence de la concentration en ions Mg^{++} sur l'activité prolineoxydasique

$MgCl_2$ μM FIOLE	ACTIVITÉ MAXIMUM μAt O/min	CONSOMMATION TOTALE		$\frac{\text{Oxygène}}{\text{Proline}}$	STABILITÉ (TEMPS au bout duquel $V < 0,40$) min
		OXYGÈNE μAt	PROLINE μM		
0	1,0	120	40	3,0	170
8	2,4	300	58	5,2	230
20	2,3	300	57	5,2	240
40	1,9	270	54	5	250

L'élévation de la teneur en magnésium au-delà de 20 micro-ions-gramme par fiole réduit sensiblement l'activité sans altérer la stabilité du système enzymatique. Le fait que, pour 40 micro-ions-gramme de Mg^{++} , la vitesse se maintienne un peu plus longtemps à une valeur supérieure à cette limite est simplement dû à ce que, l'activité étant moins grande, la concentration en proline vers la fin de la réaction est supérieure aux valeurs existantes dans les fioles contenant moins de magnésium.

La concentration optimum en ions Mg^{++} ($3,5 \times 10^{-3}$ M) correspond sensiblement à celle indiquée par POTTER (101) pour l'activation de l'ATPase mitochon-

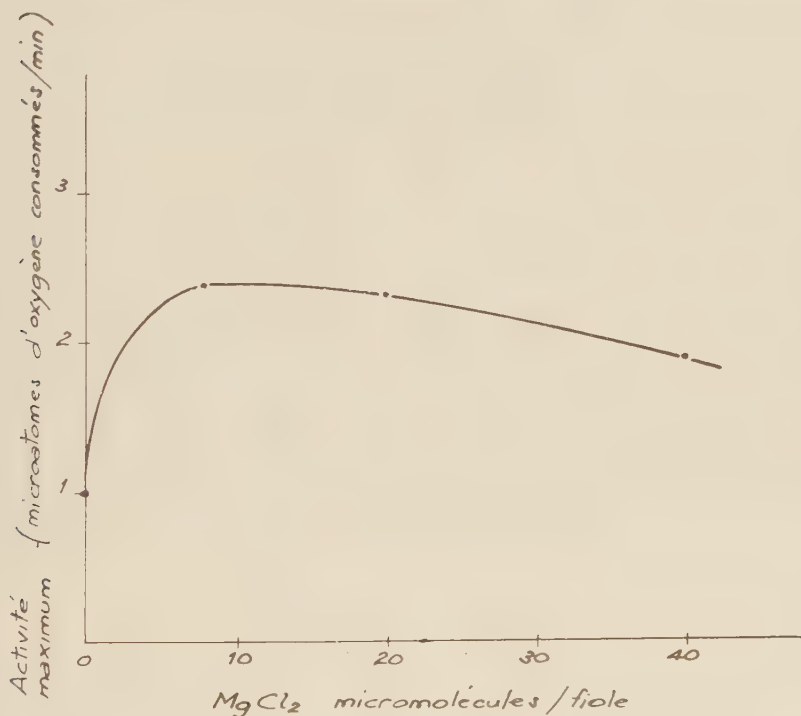


FIG. 19

Influence de la concentration en ions Mg^{++} sur l'activité maximum

driale : $2 \cdot 10^{-3}$ M, compte tenu de l'apport, par le centrimètre cube de suspension mitochondriale de 2 micromolécules d'éthylène-diamine-tétraacétate, pouvant complexer une quantité sensiblement égale de magnésium d'une manière relativement stable (78). L'activation de la respiration des mitochondries de foie de rat par les ATPases a d'ailleurs été observée directement par NIEMEYER (87).

Mais cette action du magnésium sur l'oxydation de la proline n'est sans doute pas seulement liée à l'activation de l'ATPase mitochondriale : en particulier il prévient le gonflement de mitochondries isolées d'homogénats réalisés en solution de saccharose 0,44 M additionnée d'EDTA (70) et empêche même ce gonflement sous l'action des ions calcium, peut-être par compétition avec ces ions (127).

D'après CHANCE (20), le magnésium serait plutôt un agent protecteur qu'un cofacteur nécessaire des réactions de phosphorylation et l'on a pu observer, pen-

dant de courtes incubations les mêmes taux de phosphorylation oxydative avec ou sans magnésium (26) (7). Les variations de structure de la membrane mitochondriale qui, en diminuant la perméabilité, augmentent la résistance au gonflement, peuvent expliquer que, par suite d'une moins bonne accessibilité du substrat, l'activité diminue pour des concentrations relativement fortes en ions Mg^{++} .

La stimulation de l'utilisation de l'oxygène à la concentration optimum en magnésium porte sur les différentes étapes de l'oxydation de la proline, comme le montre l'élévation du quotient $\frac{\text{oxygène consommé}}{\text{proline disparue}}$ à la suite de l'addition de magnésium au milieu (tableau 14).

Signalons que, si les concentrations variables en ions magnésium ont été obtenues avec du chlorure de magnésium, le sulfate de magnésium, à 8 micromolécules par fiole, nous a donné un résultat absolument identique : à cette concentration les anions SO_4^{--} ou Cl^- n'ont pas d'effets différents sur l'activité prolineoxydasique.

De pair avec le magnésium, a été étudié le rôle possible du potassium dans les phosphorylations oxydatives : mais si l'influence stimulante du premier est à peu près universellement reconnue, les mérites comparés des ions potassium et sodium ont donné lieu à des interprétations plus contradictoires. Les ions potassium stimuleraient la phosphorylation oxydative par les mitochondries mises en suspension dans des solutions salines ou dans l'eau (87). Mais les mitochondries isolées dans des solutions isotoniques de saccharose, suivant des techniques analogues à celle utilisée dans le présent travail, sont beaucoup moins sensibles à l'action du potassium, tout au moins en l'absence de microsomes : cet ion aurait pour seul effet de prolonger quelque peu la période d'oxydation à vitesse maximum (66). Et encore apparaît-il dans le cas présent que cet effet stabilisateur ne se manifeste qu'aux concentrations moyennes (150 à 450 micromolécules de KCl par fiole) puisque l'activité se ralentit beaucoup plus rapidement en présence de 900 micromolécules (tableau 15).

TABLEAU N° 15

Influence de la concentration en potassium sur l'activité prolineoxydasique

KCl $\mu M/\text{FIOLE}$	ACTIVITÉ MAXIMUM $\mu At\ O/\text{mn}$	CONSOMMATION TOTALE		$\frac{\text{Oxygène}}{\text{Proline}}$	STABILITÉ (TEMPS au bout duquel $V < 0,40$) mn
		OXYGÈNE μAt	PROLINE μM		
0	2,8	275	57	4,8	180
150	2,4	300	58	5,1	230
450	1,9	275	55	5	230
900	1,5	188	43	4,3	160

En conclusion, les mitochondries isolées d'homogénats de foie de rat en solution isotonique de saccharose et complexon peuvent présenter une activité prolineoxydasique spécifique élevée, variant avec la préparation entre 0,52 et 0,57 micro-atome d'oxygène absorbé par minute et par milligramme d'azote de la préparation

(ce qui correspond à un Q_0 de 80 à 90 millimètres cubes d'oxygène par heure et par milligramme de mitochondries sèches, soit 3 à 4 fois le Q_0 de la cyclophorase) (126).

Mais une telle activité nécessite, après un mode opératoire rigoureux défini au chapitre III, des conditions d'incubation bien déterminées des mitochondries et de leur substrat. Si certains constituants du milieu réactionnel étaient déjà utilisés à une concentration convenable dans les études précédentes (126), magnésium par exemple, l'existence d'un maximum dans la variation de l'activité enzymatique avec la concentration en cet ion n'avait pas été démontrée. Les mitochondries isolées exigent, pour une oxydation optimum de la L(-)proline une concentration en phosphate minéral et en accepteur de phosphate du système adénylique très supérieure à celle nécessaire à la cyclophorase, ce qui suggère une influence des réactions de phosphorylation. Les conditions requises sont par bien des points analogues à celles définies dans l'étude des phosphorylations oxydatives :

— concentration en ions potassium 0,05 M (soit 150 micromolécules par fiole contenant 1 cm³ de suspension mitochondriale correspondant à 400 mg de foie frais);

— concentration en ions magnésium 0,003 M (8 micromolécules par fiole);

— concentration en un membre du système adénylique du muscle 0,005 M (15 micromolécules par fiole), l'AMP étant un peu plus efficace que l'ATP, lui-même très supérieur à l'ADP;

— concentration en phosphate minéral 0,01 M (30 micromolécules par fiole).

Enfin le pH optimum de la réaction globale L-proline-oxygène est compris entre 7,3 et 7,7 en présence d'un tampon phosphate, tandis que la température la plus convenable se situe entre 35 et 37 °C.

CONCLUSION

L'oxydation de la L-proline observée *in vitro* en présence de coupes de rein ou de foie de rat, ou d'homogénats de rein de lapin se produit également en présence de préparations de foie acellulaires. Les caractéristiques de cette oxydation : consommation horaire spécifique d'oxygène égale à celle de la cyclophorase rénale de lapin, quantité de proline transformée supérieure, se retrouvent avec des préparations cytologiquement mieux définies, les mitochondries. La stabilité plus grande des préparations prolineoxydasiques ainsi obtenues, et une reproductibilité meilleure, quoique encore relative, des résultats justifient un isolement par centrifugations différentielles beaucoup plus laborieux que la préparation d'homogénats lavés et accompagné de précautions rigoureuses.

Nous venons de définir l'ensemble de ces précautions, au cours de l'homogénéisation du foie et de la suite des centrifugations en solution de saccharose 0,25 M : ce sont principalement la rapidité des opérations effectuées le plus possible à basse température et l'addition au milieu de séparation d'éthylène-diamine tétra-acétate de sodium, qui à une faible concentration (0,002 M) facilite la séparation des mitochondries et stabilise l'activité prolineoxydasique, soit à basse température, soit en présence de substrat dès que la température s'élève. Son emploi systématique a nettement amélioré la reproductibilité des résultats.

Dans ces conditions opératoires, nous pensons avoir établi que la prolineoxydase est bien localisée au niveau des mitochondries, les autres fractions cellulaires ne pouvant qu'activer la réaction, au détriment d'ailleurs de sa stabilité, principalement par apport d'adénosine triphosphatase.

En effet, les conditions d'activité prolineoxydasique des mitochondries de foie de rat présentent des rapports étroits avec celles qui règlent les phosphorylations oxydatives par ces mêmes particules : en particulier une certaine concentration du milieu d'incubation en phosphate minéral, et en éléments du système adénylique est nécessaire pour observer la consommation d'oxygène maximum, ainsi que le coefficient le plus élevé d'oxydation de la proline. Le rôle des ions magnésium, activateurs et stabilisants de cette réaction, est conforme à celui qu'ils jouent vis-à-vis des phosphorylations oxydatives : à l'inverse, l'inhibition par les ions calcium souligne encore ce parallélisme en même temps qu'elle explique le rôle protecteur de l'EDTA au cours de l'isolement. Rappelons enfin que la diminution observée de l'activité spécifique par dilution de la suspension enzymatique avait également été signalée dans l'étude de l'ATPase. Quant aux conditions de température et de pH optimum entre 35-37 °C et pH 7,3-pH 7,7, ce sont celles de la plupart des oxydations provoquées par les mitochondries.

Le système que nous venons de définir présente donc les caractéristiques permettant une étude de la réaction d'oxydation de la proline.

II^e PARTIE

ÉTUDE DE LA RÉACTION D'OXYDATION DE LA L-PROLINE

AU NIVEAU DES MITOCHONDRIES HÉPATIQUES

Les voies de dégradation de la proline, que nous nous sommes proposé d'étudier sous l'effet du système mitochondrial dont l'isolement a fait l'objet de la première partie de notre étude, avaient déjà donné lieu à un certain nombre de recherches, *in vivo* comme *in vitro*, que nous avons résumées dans l'introduction à ce travail.

La mise au point d'une méthode spécifique de microdosage de la proline par CHINARD, le développement des méthodes chromatographiques d'analyse des produits intermédiaires des réactions, et la découverte, précisément par chromatographie sur papier, d'acide aspartique dans le milieu d'incubation de la proline avec les homogénats lavés de foie de rat, nous ont incités à reprendre l'étude de la réaction globale d'oxydation de la proline.

Nous avons précédemment exposé les raisons pour lesquelles nous avons utilisé les mitochondries hépatiques à l'étude de cette oxydation. Mais avant d'aborder le mécanisme de l'oxydation de la L-proline par ce système enzymatique, il convenait d'en examiner les caractéristiques thermodynamiques dans les conditions retenues comme correspondant à l'activité prolineoxydasique maximum.

CHAPITRE I^{er}INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT
SUR LA VITESSE D'OXYDATION DE LA L-PROLINE

Parmi les caractéristiques thermodynamiques d'un système enzymatique, l'influence de la concentration du substrat sur la vitesse de réaction est celle qui est susceptible de fournir le plus de renseignements sur le mécanisme de cette réaction. Dès 1903, Victor HENRI avait montré l'intérêt de cette étude (46) dans le cas d'une réaction unique.

La réaction d'oxydation de la proline, telle que nous l'avons étudiée jusqu'ici comprend des étapes multiples, dont la première ne peut s'isoler de l'ensemble sans être altérée. Elle est donc plus complexe que l'inversion du saccharose par la saccharase. Cette réaction risque encore d'être compliquée par le fait que les interactions ne s'exerceront pas entre molécules, même de poids moléculaire élevé comme les protéines-enzymes, mais encore les molécules de substrat et des centres actifs localisés sur des villosités intra-mitochondriales (94).

Il n'était pas question d'éliminer ou de modifier ce facteur; cela aurait été certes concevable, soit par des extractions chimiques, soit par des moyens de désintégration physique, mais, même si nous avions retrouvé après de tels traitements une partie de l'activité prolineoxydasique initiale, nous n'aurions plus été en présence de la réaction dont nous avons précisé les conditions optima au chapitre précédent.

Par contre, il convenait de choisir un paramètre permettant une interprétation cinétique simple de la réaction. La mesure manométrique de la consommation d'oxygène adoptée pour suivre la réaction globale dans la première partie de ce travail ne convient pas. Certes cette méthode a l'avantage, et ce fut la raison de notre choix, de ne pas perturber le déroulement de la réaction. La mesure suit l'évolution du phénomène, et permet de mesurer dans une seule expérience la vitesse, d'où l'activité aux différents instants de la réaction, représentée par la pente de la tangente à la courbe de consommation d'oxygène en fonction du temps. Il est donc aisé de déduire l'activité maximum en fonction du temps. Mais cette consommation d'oxygène correspond à l'ensemble des réactions d'oxydation de la proline et de ses produits successifs de dégradation.

La mesure de la proline disparue après un certain temps de réaction est expérimentalement plus complexe car elle oblige à interrompre la réaction à l'instant choisi pour la mesure, donc pour déterminer simultanément les consommations d'oxygène et de proline à différents instants, à préparer autant d'ensembles manométriques de Warburg que de points de mesure, ce qui, en raison de la capacité limitée des thermostats, limite le nombre de déterminations, et se prête mal à des mesures systématiques. Mais cette méthode fournit directement la variation de concentration du substrat pendant un intervalle de temps déterminé, assez bonne approximation de la vitesse de réaction, définie par la vitesse de variation de la concentration en produit initial. Cependant, la vitesse ainsi déterminée ne

représente que la vitesse moyenne entre l'instant où la réaction est interrompue et le début de la réaction, d'ailleurs assez imprécis par suite de la période d'équilibration des températures entre le contenu de la fiole d'expérience et le bain thermostatique. Cette imprécision de quelques minutes (la période d'équilibration étant de 7 à 8 minutes) sur l'instant initial conduit à choisir un intervalle de mesure assez important pour diminuer l'erreur relative sur le temps. Mais cet intervalle doit rester cependant assez court aux faibles concentrations, pour arrêter la réaction quand il reste encore de la proline dans le milieu.

Nous avons fait, pour les concentrations moyennes en substrat, soit entre 10 et 30 micromolécules par fiole, deux mesures, l'une après 20 minutes, l'autre après 40 minutes de réaction.

Aux faibles concentrations initiales, inférieures à 10 μM /fiole il n'a pas été possible de poursuivre la réaction plus de 20 minutes. Au contraire, aux fortes concentrations, nous avons été limités, non par la disparition du substrat, mais par l'erreur importante qui serait résultée du calcul d'une consommation relativement faible par différence entre deux valeurs importantes : la nécessité de pipeter dans les fioles expérimentales de faibles volumes de solutions relativement concentrées introduit déjà une erreur sur la concentration initiale indiquée dans le tableau 16 colonne I, et qui correspond :

— à une erreur de $1/200 \text{ cm}^3$ sur le volume de solution à 300 $\mu\text{M}/\text{cm}^3$ introduite dans la fiole;

— à une erreur sur le titre provenant essentiellement de l'ajustage de la solution évaluée à 0,1 centimètre cube pour une fiole de 25 centimètres cubes, soit 0,4 p. 100.

A la concentration maximum étudiée, ces deux facteurs introduisent une imprécision de $\pm 2,5 \mu\text{M}$ sur la quantité de L-proline initialement présente.

Aux concentrations plus faibles va s'ajouter l'erreur provenant de la dilution de la solution mère.

En ce qui concerne la proline restant en solution au moment où l'on arrête l'expérience, valeur déterminée par la méthode colorimétrique de CHINARD (22) rappelée dans la première partie, on a vu que, en choisissant une dilution convenable pour que la prise de 1 centimètre cube destinée à la réaction colorée renferme environ 0,1 μM , l'erreur sur la densité optique est de ± 1 p. 100, l'erreur sur la prise pour colorimétrie de 0,5 p. 100, l'erreur sur la dilution de 1 p. 100, soit au total $\pm 2,5$ p. 100.

Sur le graphique 20 où sont portés les inverses des vitesses en fonction des inverses des concentrations en substrat, suivant le mode de représentation auquel LINEWEAVER et BURK ont attaché leur nom (74), les points représentatifs des vitesses de consommation de la proline en fonction de la concentration initiale en substrat ont été entourés de leur ellipse d'erreur et l'on a tracé les courbes suivantes passant au plus près des points correspondants, et en tout cas à l'intérieur des ellipses d'erreur :

- a. Vitesse moyenne calculée sur 45 minutes de réaction environ (.);
- b. Vitesse moyenne calculée sur 25 minutes de réaction environ (+);
- c. Vitesse initiale extrapolée ($\times$).

Les vitesses initiales ont été calculées pour les trois concentrations ayant donné lieu à deux mesures de consommation après 25 et 40 minutes environ de réaction (fig.21).

TABLEAU N° 16

Influence de la concentration en L-Proline sur l'activité enzymatique

Composition du milieu réactionnel par fiole :

1 cm³ de suspension mitochondriale (3,50 mg N);8 μ M de SO₄Mg; 150 μ M de KCl; 60 μ M de Phosphate de sodium pH 7,4; 15,7 μ M d'AMP;0 à 240 μ M de L-Proline;Volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau bidistillée.0,2 cm³ de KOH à 10 p. 100 dans le puits central.

Oxygénation 7 minutes. Équilibration de température 7 à 8 minutes.

CONCENTRATION EN L-PROLINE	DURÉE DE RÉACTION (temps d'équilibration compris,	PROLINE RESTANT en solution	PROLINE CONSOMMÉE	VITESSE DE CONSOMMATION de la Proline	OXYGÈNE CONSOMMÉ	VITESSE MAXIMUM de CONSOMMATION D'OXYGÈNE	QUOTIENT D'OXYDATION $\frac{\mu\text{At Oxygène}}{\mu\text{M Proline}}$
$\mu\text{M/fiole et molarité}$	min	$\mu\text{M/fiole}$	μM	$\mu\text{M/min}$	μAt	$\mu\text{At/min}$	
5 $\pm$ 0,16	22	1,2 $\pm$ 0,03	3,8 $\pm$ 0,2	0,17 $\pm$ 0,03	18,5 $\pm$ 1,5	1,03 $\pm$ 0,02	4,8 $\pm$ 0,4
1,8.10 ⁻³ M	22 mn 30 s	1,1 $\pm$ 0,03	3,9 $\pm$ 0,2		18,5 $\pm$ 1,5		
10 $\pm$ 0,16	23 mn 30 s	2,6 $\pm$ 0,06	7,4 $\pm$ 0,2	0,31 $\pm$ 0,03	31,5 $\pm$ 3	1,57 $\pm$ 0,02	4,2 $\pm$ 0,5
3,6.10 ⁻³ M	24	2,6 $\pm$ 0,06	7,4 $\pm$ 0,2		32 $\pm$ 3		
	44	0,9 $\pm$ 0,03	9,1 $\pm$ 0,2	0,20 $\pm$ 0,01	53,5 $\pm$ 4	1,7 $\pm$ 0,05	6,3 $\pm$ 0,6
	46	0,8 $\pm$ 0,03	9,2 $\pm$ 0,2		58 $\pm$ 4		
	0 (Extrapolation)			0,40		1,65 (Moyenne)	4,1
15 $\pm$ 0,16	24	5 $\pm$ 0,13	10 $\pm$ 0,3	0,41 $\pm$ 0,04	39,5 $\pm$ 3	1,85 $\pm$ 0,05	4,0 $\pm$ 0,4
5,4.10 ⁻³ M	24 mn 30 s	5 $\pm$ 0,13	10 $\pm$ 0,3		41 $\pm$ 3		

7,2.10 ⁻³ M	43	9,5 } 4,8 } 5,5 }	10,5 } 15,2 } 14,5 }	0,34 ± 0,03	75 } 73 }	2,05 ± 0,05	5 ± 0,6
	0	(Extrapolation)..... 0,45..... 2,0 (Moyenne)..... 4,5					
30 ± 0,5 10,7.10 ⁻³ M	25 mn 30 s	18,3 } 18,3 }	11,7 } 11,7 }	0,46 ± 0,07	44,5 } 45 }	2,1 ± 0,05	3,8 ± 0,7
	41	12,4 } 12,9 }	17,6 } 17,1 }	0,43 ± 0,04	79,5 } 81,5 }	2,2 ± 0,05	4,6 ± 0,4
	0	(Extrapolation)..... 0,50..... 2,15 (Moyenne)..... 4,3					
45 ± 0,5 1,6.10 ⁻² M	41 45	25 } 24 }	20 } 21 }	0,48 ± 0,04	82,5 } 89,5 }	2,3 ± 0,05	4,2 ± 0,4
65 ± 1,6 2,3.10 ⁻² M	41 44	40 } 39,5 }	25 } 25,5 }	0,60 ± 0,07	89 } 90 }	2,3 ± 0,05	3,5 ± 0,5
98 ± 1,6 3,5.10 ⁻² M	44 46	70 } 72,5 }	28 } 26,5 }	0,60 ± 0,08	96 } 90 }	2,3 ± 0,1	3,5 ± 0,6
128 ± 1,6 4,6.10 ⁻² M	44	106 ± 2,5	24 ± 4	0,54 ± 0,1	83 ± 3	2,3 ± 0,1	3,5 ± 0,7
150 ± 2 5,4.10 ⁻² M	46	125 ± 3	25 ± 5	0,55 ± 0,15	85 ± 4	2,1 ± 0,2	3,4 ± 1
240 ± 2,5 8,6.10 ⁻² M	43 44	222 } 220 }	18 } 20 }	0,44 ± 0,2	92 } 85 }	2,2 ± 0,2	4,6 ± 2

Comment interpréter le graphique 20? Compte tenu de la précision toute relative des résultats, bien que la marge d'erreur représentée par les ellipses de la figure soit une limite certainement très supérieure aux divergences réelles puisque les quantités de proline consommée toutes choses égales d'ailleurs dans deux fioles distinctes s'écartent beaucoup moins l'une de l'autre que le laisserait prévoir le calcul d'erreurs, et en négligeant les concentrations supérieures à 100 μM /fiole, il semble que l'oxydation de la proline par les mitochondries suive la loi dite de MICHAELIS, la vitesse maximum étant de 0,62 micromolécule/mn pour une quantité de mitochondries correspondant à 3,5 mg d'azote total soit 0,18 micromolécule/mn/mg d'azote.

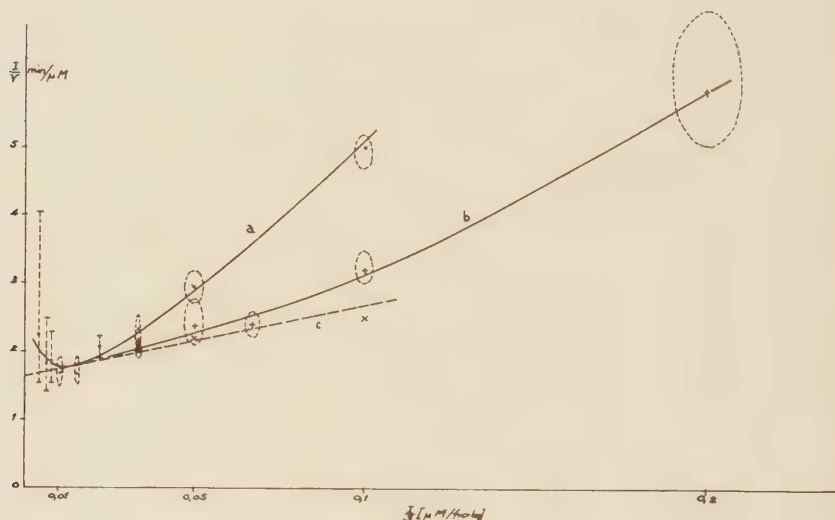


FIG. 20

Influence de la concentration en L-proline sur sa vitesse de transformation par les mitochondries

Courbe a : vitesse moyenne calculée sur quarante-cinq minutes de réaction environ.

Courbe b : vitesse moyenne calculée sur vingt-cinq minutes de réaction environ.

Courbe c : vitesse extrapolée à l'instant initial.

Composition du milieu : voir tableau n° 16.

L'équation de la droite reliant les points représentatifs des valeurs extrapolées est, dans ce mode de représentation, d'après la théorie de V. HENRI et MICHAELIS :

$$\frac{V_M}{V} = 1 + \frac{K_M}{(S)}$$

D'après cette équation, si $V = \frac{V_M}{2}$, $K_M = (S)$.

La valeur de la constante K_M est donc égale à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale est la moitié de la vitesse maximum. On calcule immédiatement d'après la figure 20 que cette concentration correspondant à la vitesse initiale $\frac{1}{3,3} \mu\text{M}/\text{mn}$ est égale à $\frac{1}{0,16} \mu\text{M}/\text{fiole}$. En exprimant la concentration en molécules par litre :

$$K_M = \frac{1}{0,16} \times \frac{10^{-3}}{2,8} = \underline{2,2 \cdot 10^{-3} \text{ M/litre.}}$$

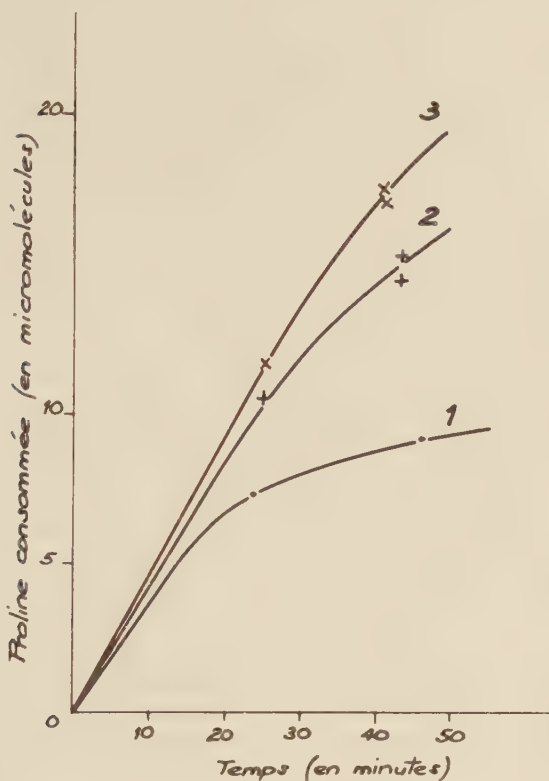


FIG. 21

Consommation de proline en fonction du temps

Concentration initiale en substrat :

Courbe 1 : 10 μ M. Courbe 2 : 20 μ M. Courbe 3 : 30 μ M

Cette valeur plus forte que celle signalée pour la déshydrogénase succinique par SCHLENK (111) : $0,27 \cdot 10^{-3}$ M, est du même ordre que les valeurs indiquées pour la deshydrogénase glutamique : $7,5 \cdot 10^{-3}$ M par DEWAN (29); $1,1 \cdot 10^{-3}$ M par OLSON et ANFENSEN (92).

Quelle interprétation peut-on donner du ralentissement de la vitesse de consommation de la proline quand la concentration initiale dépasse 100 micromolécules par fiole? Quelle valeur faut-il d'ailleurs attacher à ces mesures en raison de la part d'erreur considérable qu'elles peuvent comporter? Il semble cependant qu'aux fortes concentrations le ralentissement de la réaction soit réel, puisqu'il se manifeste d'une manière moins importante certes, mais avec une marge d'erreur plus faible, si l'on se réfère à la vitesse maximum de consommation d'oxygène comme mesure de la vitesse de réaction (fig. 22). Or, si l'on ne peut affirmer que ces deux vitesses gardent entre elles un rapport constant, en raison de l'influence plus ou moins grande des réactions d'oxydation des produits de transformation de la proline, elles doivent cependant varier dans le même sens.

Les fortes concentrations de L-proline inhibent donc l'oxydation de ce substrat par les mitochondries. Cette inhibition ne semble pas due à la complexation par la proline d'un activateur de la réaction. Certes, MARTELL et CALVIN (78) ont noté la stabilité relativement importante du complexe proline-magnésium (sa constante de stabilité étant de l'ordre de 10^4) et l'on a montré dans la première partie la nécessité d'une concentration optimum en magnésium pour une vitesse d'oxydation maximum de la proline. Mais ALBERT, dans une étude plus approfondie (3), a indiqué que si, parmi les acides aminés étudiés, la proline avait effectivement l'affinité la plus grande pour tout un groupe de cations divalents comprenant l'ion magnésium, il était nécessaire de tenir compte, pour évaluer l'importance des complexes formés, des constantes d'ionisation des amino-acides. Or, à pH 7,3,

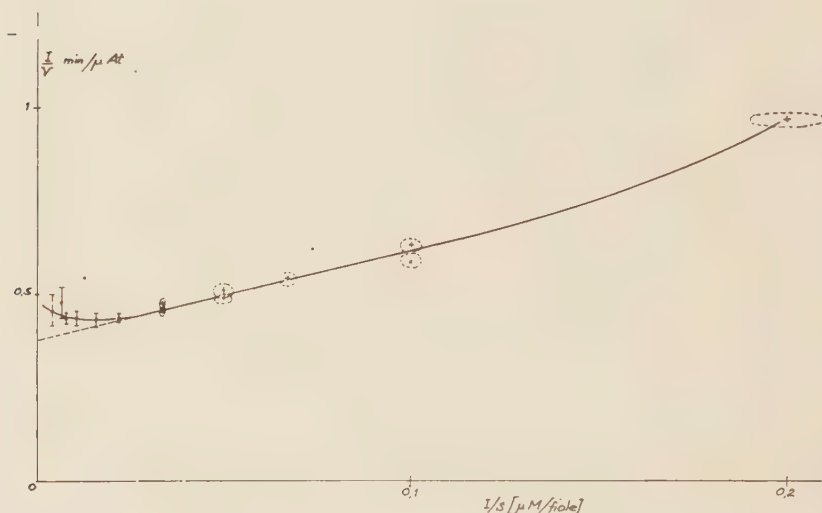
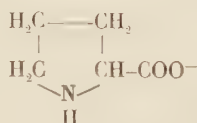


FIG. 22

Influence de la concentration initiale en L-proline sur la vitesse maximum de consommation d'oxygène de la suspension mitochondriale.

c'est-à-dire à un pH très voisin de celui du milieu d'incubation des mitochondries, il n'y a que 0,04 p. 100 de proline sous la forme ionisée capable de former des complexes :



Si K_s désigne la constante de stabilité du complexe :

$$K_s = \frac{(\text{Mg complexé})}{(\text{Mg}^{++} \text{ libre}) (\text{anion proline})^3} = \frac{(\text{Mg}^{++} \text{ total} - \text{Mg}^{++} \text{ libre})}{(\text{Mg}^{++} \text{ libre}) (\text{proline}^-)^2}$$

Or, à la plus forte des concentrations en proline des expériences présentes ($8,6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) :

$$(\text{proline}^-) = 4 \cdot 10^{-4} (\text{proline totale}) = 4 \cdot 10^{-4} \times 8,6 \cdot 10^{-2}$$

$$\approx 3,5 \cdot 10^{-5} \text{ ion/litre}$$

$$(\text{Mg}^{++} \text{ libre}) = \frac{(\text{Mg total})}{1 + K_s (\text{proline}^-)^2}$$

$$(\text{Mg complexé}) \approx (\text{Mg total}) \times K_s (\text{proline}^-)^2.$$

Même si K_s est de l'ordre de 10^4 :

$$(\text{Mg complexé}) = 1,2 \cdot 10^{-5} (\text{Mg}^{++} \text{ total}).$$

La concentration en magnésium choisie correspondant à l'activité maximum de la préparation, une proportion aussi faible de complexe ne saurait introduire de variation notable d'activité. La même conclusion peut s'appliquer à l'influence de la complexation de tout activateur de la réaction par la proline, qui impliquerait la forme ionisée de cet imino acide.

Mais ces fortes concentrations en substrat (0,05 à 0,08 moléculaire) augmentent notablement la tonicité du milieu d'incubation, et cette hypertonicité va diminuer la vitesse d'oxydation par les mitochondries (99). Cette transformation du milieu peut suffire à expliquer la baisse d'activité constatée, sans faire intervenir de modification du complexe enzyme-substrat.

Le ralentissement de la réaction aux très faibles concentrations paraît plus rapide que ne l'impliquerait la cinétique de MICHAELIS. Mais cette divergence s'explique beaucoup plus simplement que dans le cas précédent par l'écart entre la vitesse initiale de consommation de proline et la vitesse moyenne mesurée après un certain temps; cet écart croît quand la concentration diminue, car on s'éloigne de plus en plus de l'hypothèse de l'état stable sur lequel repose la théorie.

Sur la base des vitesses initiales déduites de la courbe des extrapolations, la concentration initiale est réduite de 20 p. 100 :

- en 3 minutes pour une concentration initiale de $5 \mu\text{M}/\text{fioule}$;
- en 5 minutes pour une concentration initiale de $10 \mu\text{M}/\text{fioule}$;
- en 9 minutes pour une concentration initiale de $20 \mu\text{M}/\text{fioule}$;
- en 12 minutes pour une concentration initiale de $30 \mu\text{M}/\text{fioule}$.

La concentration initiale en substrat a-t-elle une influence sur le schéma de la réaction, se traduisant par des variations du degré de transformation de la proline, repéré par le rapport de l'oxygène consommé à la proline transformée? D'après les valeurs figurant dans la dernière colonne du tableau 16, reportées sur la figure 23, il semblerait que l'augmentation de la concentration diminue le degré de transformation. Mais il faut remarquer :

1° Que les valeurs calculées par extrapolation ne suivent pas cette loi, les variations n'étant pas significatives au regard de la précision des résultats;

2° Que l'élévation du degré de transformation aux concentrations relativement faibles se manifeste surtout après la plus longue des deux périodes de réaction laissant très peu de proline dans le milieu.

Inversement, si l'on suit l'évolution du degré de transformation en fonction du temps, on ne constate, dans l'ensemble des mesures rassemblées dans le tableau 16

de variation significative qu'aux faibles concentrations : 10 micromolécules par fiole. Aussi n'y a-t-il pas opposition entre ce résultat et le fait que, dans une expérience différente, où l'on suivait simultanément en fonction du temps la consommation d'oxygène et la consommation de proline, grâce à un certain nombre d'ensembles manométriques arrêtés à des instants différents, on ait enregistré une valeur sensiblement constante du rapport $\frac{\text{oxygène}}{\text{proline}}$ (fig. 24) après la période de démarrage d'une vingtaine de minutes.

Une explication de ces variations sera esquissée dans un chapitre ultérieur, en examinant le mécanisme de la réaction d'oxydation de la proline.

Dès maintenant, il est possible de conclure de cette étude de la cinétique de la réaction, qu'il y a formation d'un complexe entre le substrat et les groupes à acti-

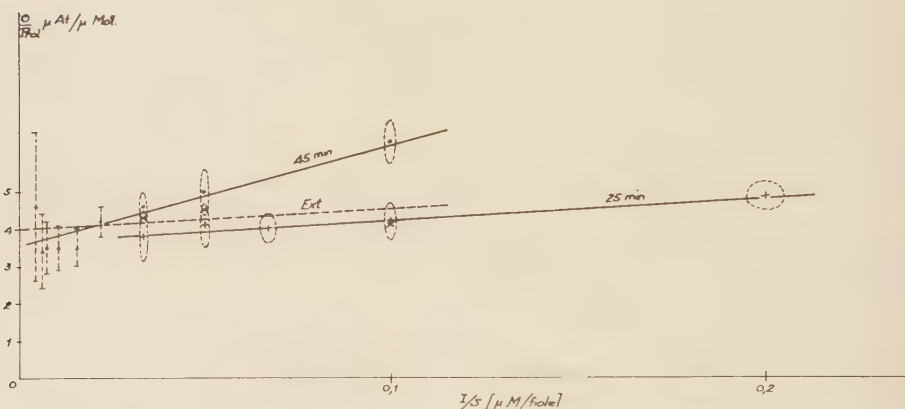


FIG. 23

Influence de la concentration initiale en L-proline sur le quotient de transformation de la proline

$$\left(\text{rapport } \frac{\text{oxygène consommé } (\mu\text{At})}{\text{proline disparue } (\mu\text{M})} \right)$$

tivité prolineoxydasique des mitochondries, dont la décomposition se produit suivant des réactions du premier et du second ordre conformément à la théorie de V. HENRI. Dans les conditions de tonicité correspondant à la composition du milieu d'incubation entre 5 et 100 micromolécules de substrat par fiole d'expérience, la perméabilité de la membrane mitochondriale n'est donc pas l'élément déterminant de la cinétique de la réaction.

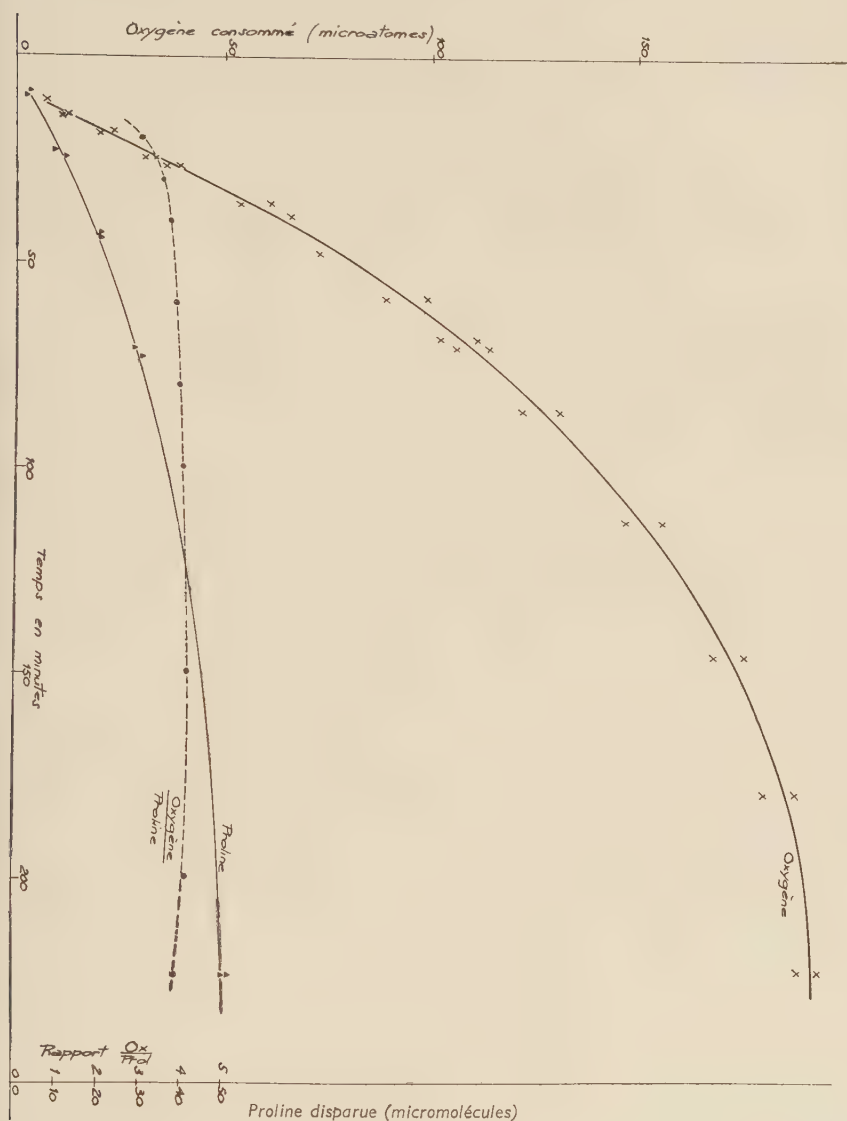


FIG. 24

Oxydation de la L-proline en fonction du temps (Exp. n° 73)

Composition du milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale (3,84 mg N).

8 μM de SO₄Mg; 150 μM de KCl; 30 μM de phosphate de sodium pH 7,4; 15,6 μM d'AMP; 60 μM de proline.

Volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau bidistillée.

Potasse dans le puits central. — Oxygénation sept minutes. Équilibrage de température huit minutes. — Arrêt de la réaction par congélation brutale du contenu des fioles dans l'acétone et la neige carbonique, avant addition d'acide trichloracétique.

CHAPITRE II

SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE
DES MITOCHONDRIES HÉPATIQUES DU RAT

Nous venons d'examiner la cinétique du comportement des mitochondries vis-à-vis de la L-proline dans des conditions expérimentales bien définies. Ce comportement est lié à la présence dans ces corpuscules cytoplasmiques de groupes actifs, le mot groupe désignant autant des structures cytologiques que les arrangements stéréochimiques actifs des protéines-enzymes.

Nous nous sommes efforcé de saisir le premier stade d'oxydation de la proline en suivant la disparition du substrat plutôt que la consommation d'oxygène, ou en rapportant celle-ci à l'instant initial. Nous avons ainsi évité les altérations de cette phase initiale par les artifices destinés à arrêter les stades ultérieurs d'oxydation (absence d'esters de l'adénosine (126) — altération des mitochondries (64) — addition d'inhibiteurs arsenicaux (107)).

Mais la réaction globale d'oxydation comportant plusieurs étapes va mettre en œuvre d'autres enzymes que la prolineoxydase. Les mitochondries ont d'ailleurs un assortiment enzymatique très complet leur permettant de jouer un rôle prééminent dans la respiration cellulaire (50) : en particulier elles sont normalement le siège de l'oxydation de l'acide glutamique et de la plupart des réactions du cycle des acides tricarboxyliques. Il convenait de voir si, parmi tout cet assortiment enzymatique, nos conditions d'isolement conservaient les enzymes capables d'oxyder les produits intermédiaires du métabolisme de la proline.

Nous avons été ainsi conduits à étudier ces activités enzymatiques dans les conditions optima pour l'oxydation de la proline, conditions qui seraient vraisemblablement différentes pour chacun des autres substrats.

I. — ISOMÈRES OPTIQUES DE LA PROLINE

Mais quelle est tout d'abord la spécificité optique de la prolineoxydase mitochondriale?

D'après LANG et SCHMID (64) des homogénats lavés de foie de chien, analogues à la cyclophorase, oxydent aussi bien la D(+) que la L(—)proline. Ces oxydations partielles en l'absence d'esters phosphorés de l'adénosine aboutissent à partir de la D(+)proline, à la formation d'acide α -cétodéhydro- δ -amino valérique, tandis que la L(—)proline s'oxyde en semialdéhyde glutamique. Au contraire, TAGGART et KRAKAUR (126) ont indiqué, sans d'ailleurs préciser leurs conditions expérimentales, l'absence d'activité de la prolineoxydase de rein de lapin vis-à-vis de la D(+)proline.

Nous avons abouti aux mêmes conclusions, sans isoler l'isomère D, en comparant l'oxydation du racémique à celle de la L(—)proline (fig. 25). La vitesse maximum de consommation d'oxygène diminue de 2,5 μ At/mn en présence de L-proline à 2,2 en présence du racémique, réduction correspondant sensiblement à

celle que l'on a signalée au chapitre précédent sous l'influence d'une diminution de concentration en substrat.

La consommation totale d'oxygène, au moment où le ralentissement des réactions est presque total est, dans le cas de la DL proline un peu supérieure à la moitié de celle qu'on observe en présence de l'isomère L.

Mais surtout, il reste 28 micromolécules de proline dans la fiole contenant au départ 60 micromolécules de racémique, contre 1 micromolécule dans la fiole ayant contenu initialement 60 micromolécules de L-proline. A la précision des mesures près, 50 p. 100 seulement de la proline racémique a donc été oxydée.

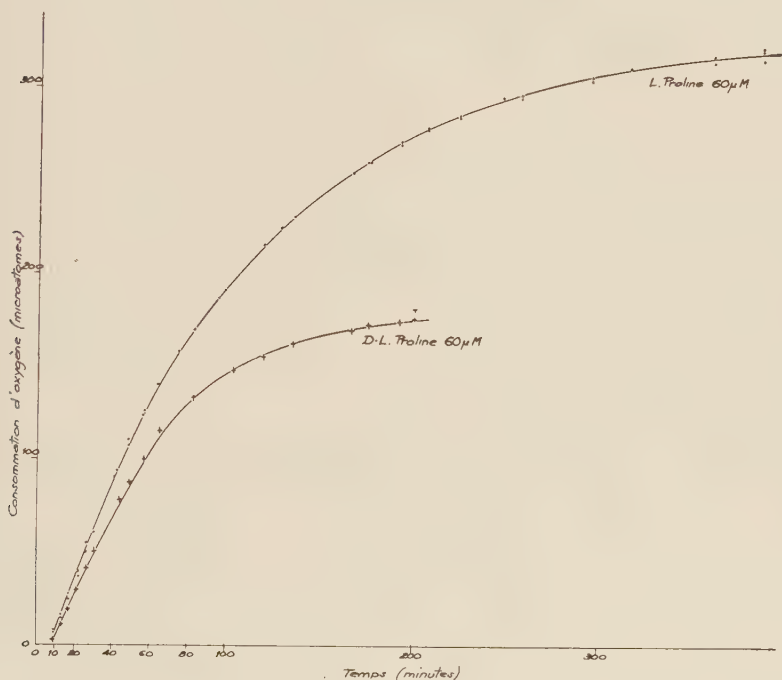


FIG. 25

Activité comparée des mitochondries hépatiques de rat vis-à-vis de la L-proline et de la DL-proline

L'expérience, répétée en fiole d'ERLENMEYER sur des volumes plus grands de solution de même composition, a montré la disparition d'exactement 50 p. 100 de proline racémique. Le composé restant, responsable de la réaction colorimétrique de CHINARD est bien la proline comme le montre la chromatographie sur papier de la solution déprotéinisée à l'acide trichloracétique et chromatographiée successivement sur Amberlite et sur Dowex 50 pour obtenir un spot sensiblement unique.

La prolineoxydase mitochondriale n'oxyde donc que l'isomère L, sans que l'isomère D exerce d'inhibition sensible.

II. — ISOMÈRES OPTIQUES DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

Il n'en va pas de même en ce qui concerne les acides D(—) et L(+)glutamiques. Ce point méritait d'être examiné car l'acide glutamique est depuis longtemps considéré comme l'un des premiers produits de transformation de la proline lors de son oxydation et nous apporterons au chapitre suivant des preuves supplémentaires de sa formation. Une inhibition importante, de l'ordre de 50 p. 100, de la deshydrogénase L-glutamique par l'acide D-glutamique à des concentrations égales à celles du substrat ayant été indiquée par OLSON et ANFINSEN (92), nous avons, en vue d'élucider les premiers stades d'oxydation de la proline, examiné si une concentration suffisante en cet isomère arrêterait cette transformation au stade de l'acide L-glutamique. Cet arrêt aurait en outre entraîné une accumulation des produits intermédiaires entre la proline et l'acide glutamique.

a. ACTIVITÉ OXYDASIQUE DES MITOCHONDRIES VIS-À-VIS DE L'ACIDE L GLUTAMIQUE

Nous avons au préalable voulu vérifier que, si l'acide glutamique se formait effectivement dans le catabolisme de la proline par les mitochondries, ces dernières, dans les mêmes conditions de milieu et de température étaient capables de l'oxyder à son tour. Cette activité L-glutamique-oxydasique a déjà été signalée dans les mitochondries hépatiques et dans la cyclophorase de rein de lapin (123). On pourrait être surpris, au premier abord, d'enregistrer aux mêmes concentrations initiales en substrat (60 μM /fiole), des vitesses de consommation d'oxygène égales pour l'oxydation de la L-proline et de l'acide L-glutamique (fig. 26 A) (2,4 μAt d'oxygène/mn).

En effet, la transformation d'une molécule de proline en acide glutamique requiert 1 molécule d'oxygène, et l'oxydation de la première devrait s'accompagner d'une consommation d'oxygène plus élevée. A une concentration en substrat moins forte (30 μM /fiole), la vitesse maximum de consommation d'oxygène en présence de glutamate s'est montrée soit encore identique (fig. 27), soit même un peu supérieure (fig. 26 B : 2,3 μAt /mn contre 2,2) à celle enregistrée en présence de proline. Il n'y a donc pas de différence significative de vitesse maximum de consommation d'oxygène entre l'oxydation du L glutamate et celle de la L-proline. Une première interprétation pourrait être que les quantités d'acide aminé (proline ou glutamate) mises en œuvre dépassent les possibilités d'oxygénation du système, par suite d'une insuffisance du système cytochrome-oxydasique transporteur. Mais s'il en était ainsi, la disparition d'oxygène ne serait pas plus rapide en présence de 60 que de 30 micromolécules de proline, et l'addition de 30 micromolécules de glutamate à 30 micromolécules de proline ne modifierait pas cette vitesse de consommation. Or, on peut constater sur la figure 27 une nette accélération de cette consommation (2,7 μAt oxygène/mn au lieu de 2,1 pour la proline ou l'acide glutamique seuls) la vitesse reste cependant inférieure à la somme des vitesses maximum des deux réactions.

Cette identité des vitesses d'oxydation de la L-proline et de l'acide L-glutamique, mesurée par la consommation d'oxygène, traduit-elle l'identité des enzymes responsables de ces oxydations? La vitesse d'oxydation plus grande du mélange « L-proline, acide L-glutamique » que de chacun de ces acides aminés, observée également par TAGGART (126) dans le cas de la cyclophorase, l'amenait à considérer comme distincts les enzymes qui en étaient responsables. Si cette démons-

tration était insuffisante puisque cette accélération n'était pas comparée à celle qui suivait une simple augmentation de la concentration en l'un des substrats, le rapprochement des résultats consignés dans les tableaux 16 et 17 montre que le relèvement de la vitesse maximum de consommation d'oxygène pour une augmentation de la concentration initiale en L-proline de 30 à 60 micromolécules par fiole est beaucoup moins important que celui résultant de l'addition de 30 micromolécules de L-glutamate à 30 micromolécules de L-proline.

L'existence de deux enzymes, que l'influence du D-glutamate sur ces oxyda-

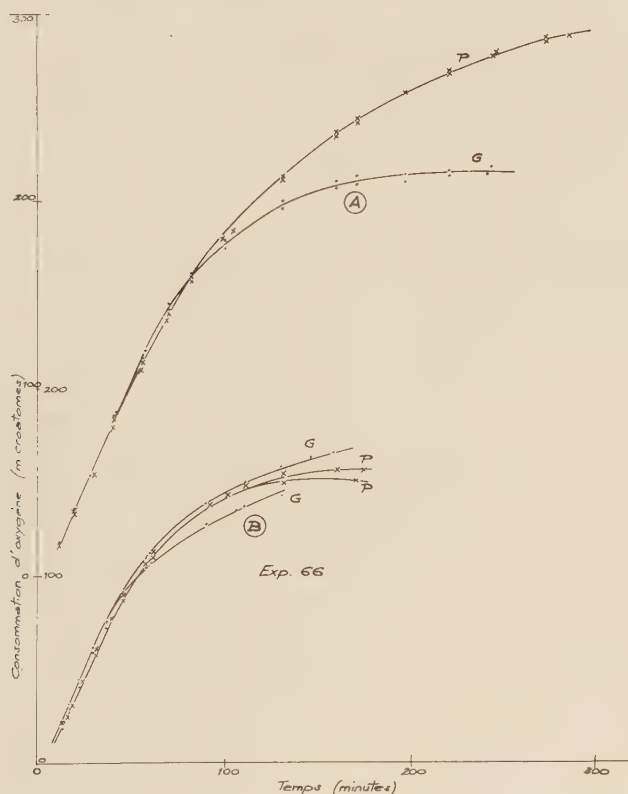


FIG. 26

Activité oxydasique comparée des mitochondries vis-à-vis de la L-proline et de l'acide L-glutamique

Concentration en substrat :

Courbes A-P : proline 60 μ M; A-G : acide glutamique 60 μ M,

Courbes B-P : proline 30 μ M; B-G : acide glutamique 30 μ M.

tions permettra de différencier davantage encore, explique que les mitochondries puissent consommer autant d'oxygène en présence de glutamate ou de proline : la transformation initiale de la proline étant progressive (fig. 21), les concentrations en glutamate à l'intérieur des mitochondries sont inférieures à celles réalisées par apport externe, et la vitesse initiale de consommation d'oxygène pour les

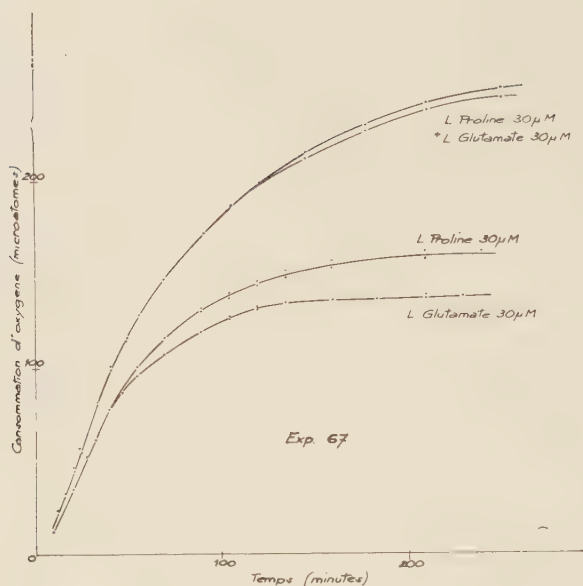


FIG. 27

Influence du L-glutamate sur l'oxydation de la L-proline par les mitochondries

stades suivant le glutamate est plus faible si la proline est le substrat initial que si les mitochondries sont directement incubées avec du glutamate.

b. POUVOIR INHIBITEUR DU D-GLUTAMATE

Dans nos conditions expérimentales, le D-glutamate n'est pas oxydé par les mitochondries hépatiques du rat, la consommation d'oxygène des suspensions mitochondriales étant même légèrement inférieure à la respiration pourtant très réduite de ces suspensions en l'absence de substrat. De plus, cet isomère inhibe fortement l'oxydation du L-glutamate, et nettement, quoiqu'à un degré moindre celle de la L-proline. Plus exactement, comme il apparaît à la lecture du tableau 17 l'acide D-glutamique n'altère pas la dégradation de la proline, mais diminue la consommation d'oxygène qui l'accompagne normalement.

L'influence de concentrations croissantes en D-glutamate, pour des concentrations constantes en substrat (30 micromolécules) se traduit par les courbes de la figure 28 : dans le cas de la proline, on peut en déduire une relation simple entre les inverses des activités et la concentration en inhibiteur :

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V} + K(I)$$

V désignant la vitesse de la réaction en l'absence d'inhibiteur;

V_i désignant la vitesse de la réaction inhibée;

(I) désignant la concentration en inhibiteur,

mais V et K peuvent être des fonctions de la concentration en substrat qui est ici maintenue constante.

TABEAU N° 11

Influence du D-Glutamate sur les activités Proline et glutamique-oxydasiques des mitochondries

Composition du milieu réactionnel par foie de Warburg :

1 cm³ de suspension mitochondriale;

8 μ M de SO₄Mg; 150 μ M de KCl; 60 μ M de Phosphate de sodium pH 7,4; 15,7 μ M d'AMP;

Concentrations variables en L-Proline, L-Glutamate et D-Glutamate;

Volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau bidistillée.

0,2 cm³ de KOH à 10 p. 100 dans le puits central. --- Oxygénation 10 minutes. --- Équilibrage de température 10 minutes.

N° EXPÉRIENCE (TENUE EN de la suspension mitochondriale)	SUBSTRAT L-PROLINE (Pr) ou L-Glutamate (G)	D-GLUTAMATE μ M/foie	ACTIVITÉ MAXIMALE V	INITIATION $\frac{V - V_1}{V}$	CONSOMMATION TOTALE d'Oxygène μ l	CONSOMMATION TOTALE de Proline μ M	QUOTIENT D'OXYDATION $\frac{\mu\text{At Oxygène}}{\mu\text{M Proline}}$	RÉDUCTION DU QUOTIENT d'oxydation p. 100
N° 66 (3,44)	μ M/foie			p. 100				
	30 G	—	2,3	—	168	—	—	
	30 G	30	1,2	48	95	—	—	
	30 Pr	—	2,2	—	157	30	5,2	
	30 Pr	30	1,5	32	142	30	4,7	9,5
	60 Pr	—	2,6	—	248	58	4,3	
N° 67 (3,50)	μ M/foie							
	30 G	—	2,1	—	137	—	—	
	30 G	60	0,9	57	87	—	—	
	30 Pr	—	2,1	—	160	30	5,3	
	30 Pr	60	1,25	40	120	29	4,1	23
	30 Pr } + 30 G }	—	2,7	—	245	30	—	
N° 68 (3,62)	μ M/foie							
	30 G	120	0,7	66	75	—	—	
	30 Pr	—	2,1	—	175	30	5,9	32
	30 Pr	120	0,9	57	115	28,5	4,0	30
	60 Pr	120	1,0	58	165	55	3	
	15 Pr	—	1,65	—	94	15	6,3	
	15 Pr	120	0,8	52	57	14,5	4,0	37

L'oxydation du L-glutamate est inhibée plus fortement, et suivant une loi non linéaire par la présence de son isomère optique. L'égalité des vitesses de consommation d'oxygène, que l'on constate en l'absence d'inhibiteur est rompue quand la concentration de celui-ci augmente.

Peut-on préciser, dans le cas de la proline, la nature cinétique de cette inhibition? L'expérience n° 68, où variait la concentration du milieu en substrat, tandis que la quantité d'inhibiteur était constante, a été réalisée dans ce but, et les résul-

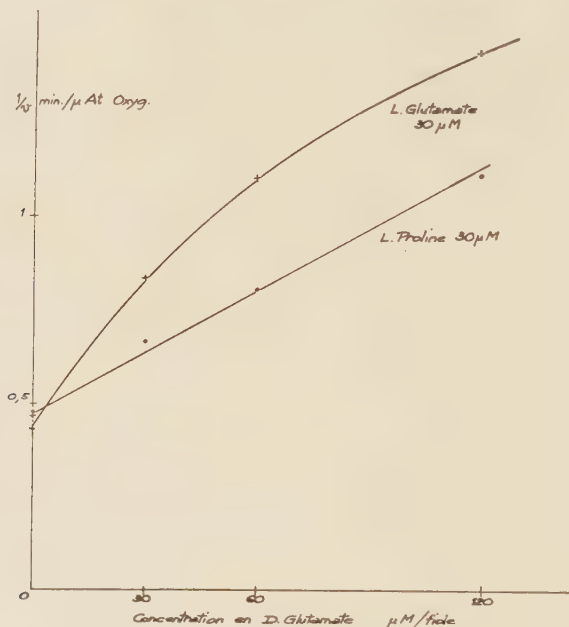


FIG. 28

Inhibition par le D-glutamate de l'oxydation de la L-proline et de l'acide L-glutamique
Influence des concentrations croissantes en inhibiteur.

tats consignés dans le tableau 17 ont été reportés sur la figure 29 suivant la représentation graphique de LINEWEAVER et BURK (74). Les deux droites ainsi obtenues sont sensiblement parallèles, cas signalé par FRIEDENWALD (34) si l'inhibiteur se combine seulement avec le complexe enzyme-substrat, et non avec l'enzyme libre. Si le caractère global de la réaction étudiée par la méthode de mesure manométrique empêche l'analyse rigoureuse du phénomène d'inhibition, qui serait nécessaire pour étayer cette hypothèse, les résultats obtenus permettent d'affirmer que l'inhibition de la prolineoxydase par le D-glutamate n'est pas compétitive.

De plus, le D-glutamate ne bloque pas le premier stade d'oxydation puisqu'en fin de réaction tout le substrat initialement introduit a disparu, mais le tableau 17 montre un net abaissement du quotient d'oxydation de la proline $\frac{(\text{Ox})}{(\text{Pr})}$. Le D-glutamate inhibe donc l'oxydation de la L-proline au stade de l'oxydation de l'acide glutamique, ou à un stade ultérieur, puisque le pourcentage d'inhibition de cette dernière réaction est supérieur à celui de la réaction globale d'oxydation de la proline.

En conclusion l'inhibition de la prolineoxydase par le D-glutamate montre que les enzymes proline et glutamique oxydasiques portés par les mitochondries sont différents, mais est insuffisante à arrêter la réaction au stade L-glutamate et à amener une accumulation des premiers produits de transformation. De plus, les concentrations importantes d'acide D-glutamique à mettre en œuvre pour aboutir à une inhibition notable de la réaction rendent difficile l'analyse même qualitative

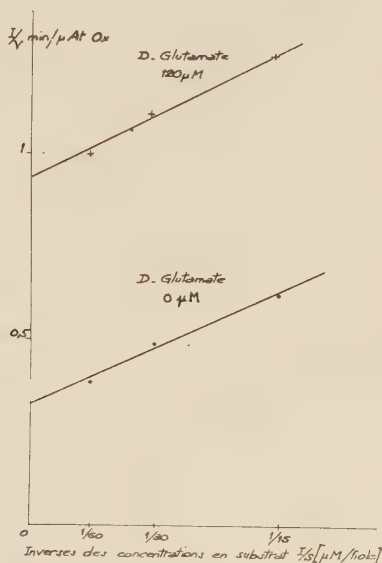


FIG. 29

Inhibition par le D-glutamate de l'oxydation de la L-proline
Influence des concentrations croissantes en substrat.

de la réaction par les procédés de séparation chromatographique : l'acide L-glutamique, qui se forme déjà dans l'oxydation normale de la L-proline (photographie de chromatogramme, n° 1, planche VI, p. 87) et dont la concentration pourrait s'accroître à la suite de l'inhibition partielle de la réaction serait masqué par les doses très supérieures de son isomère.

III. — ACIDE ASPARTIQUE

Par contre, ces chromatogrammes montrent l'accumulation dans le milieu d'oxydation de la L-proline par les mitochondries d'une quantité notable d'acide aspartique, sans qu'il soit besoin de bloquer en quoi que ce soit la réaction, accumulation que nous avons déjà signalée dans l'oxydation par les homogénats lavés de foie de rat (107). L'acide aspartique se forme également dans l'oxydation de l'acide glutamique par les mitochondries et la comparaison de ces chromatogrammes avec celui que fournit un milieu d'incubation des mitochondries exempt de substrat (photographie I, planche VI bis) montre que l'acide aspartique trouvé provient bien de la transformation de la proline ou de l'acide glutamique. Nous exa-

minerons dans un chapitre ultérieur l'interprétation de ces faits, mais ces constatations nous ont incité à étudier le comportement de notre système enzymatique vis-à-vis de l'acide L-aspartique, dans le cadre de l'étude de la spécificité d'action enzymatique des mitochondries hépatiques.

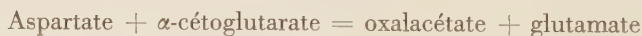
En présence d'AMP, et toujours dans les conditions optima d'oxydation de la proline, les mitochondries, pas plus que la cyclophorase rénale (123), n'oxydent l'acide L-aspartique d'une manière sensible (fig. 30 B) tandis que la respiration de l'homogénat d'où l'on isole ces mitochondries est davantage stimulée par la présence de cet acide (fig. 30 A). Par contre, on enregistre une oxydation réduite mais nette de l'acide aspartique par les mitochondries si l'ATP est substitué à l'AMP dans le milieu d'incubation (fig. 30 C).

Les mitochondries, isolées en solution de saccharose isotonique, se comportent donc sensiblement comme les particules lavées préparées par NAKADA et WEINHOUSE (85) selon la méthode de LEHNINGER (69) dont se rapproche beaucoup la méthode suivie au début de notre étude.

La supériorité de l'homogénat sur les mitochondries, pour l'oxydation de l'acide L-aspartique, malgré la concentration plus faible en particules actives, peut s'expliquer par une teneur plus élevée en transaminase asparto-glutamique (NAKADA ne retrouvait dans ses particules que 25 p. 100 de l'activité de l'homogénat) et par la présence d'une grande quantité de substrat endogène permettant la formation d' α -cétoglutarate nécessaire à cette transamination. L'activation plus grande par l'ATP que par l'AMP, à la différence des résultats observés dans l'oxydation de la proline peut s'expliquer par le rôle de l'ester triphosphorique dans la synthèse du pyridoxal-phosphate, coenzyme de la transamination. Or, si le métabolisme de l'acide aspartique nécessite initialement une transamination, en l'absence de substrat dans la suspension mitochondriale, aucune réaction de phosphorylation oxydative ne pourra engendrer les liaisons phosphate riches en énergie susceptibles de former le pyridoxal-phosphate et d'amorcer ainsi la réaction.

Il ne semble donc pas indispensable, dans ce cas, de faire appel, pour expliquer le rôle de l'ATP, à la phosphorylation de l'acide aspartique en β -L-aspartyl phosphate observée par BLACK (15) dans le cas de la levure.

En tout état de cause, l'oxydation de l'acide L-aspartique par les mitochondries est suffisamment faible pour que, s'il vient à se former dans l'oxydation de la proline, il s'accumule presque en totalité. D'autant que la réaction de transamination :



dans le sens qui permettrait la transformation de l'acide aspartique, sera inhibée par la présence de l'acide glutamique provenant de l'oxydation de la proline.

Si le foie est capable de synthétiser la citrulline et de la condenser avec l'acide aspartique en produisant de l'arginine et de l'acide fumarique (103), cette dernière réaction ne paraît pas, dans nos conditions expérimentales, se localiser au niveau des mitochondries. Même en présence d'ATP, destiné à amorcer la réaction en l'absence de substrat directement oxydable pouvant donner une réaction couplée de phosphorylation, on ne décèle pas, dans l'incubation de mitochondries hépatiques en présence d'acide aspartique et de citrulline, l'apparition d'une quantité notable d'arginine, ni une élévation sensible de la consommation d'oxygène (fig. 31). Or, les mitochondries, dans les conditions où elles oxydent la proline, sont tout à fait aptes à métaboliser l'acide fumarique, comme d'ailleurs d'autres

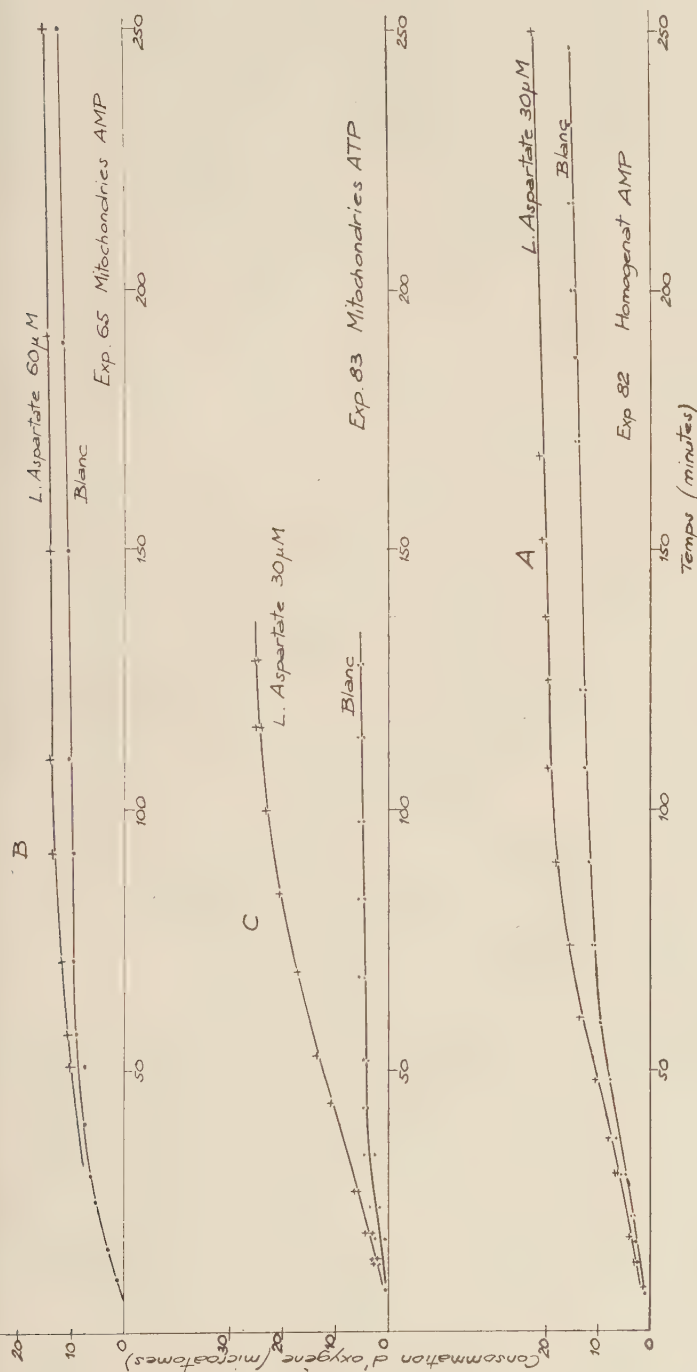


FIG. 30

Oxydation de l'acide L-aspartique par les mitochondries ou l'homogénat de foie de rat

Composition du milieu par foie :

Suspension enzymatique (mitochondries (A et C) ou homogénat (B) en solution de saccharose 0,25 M + EDTA 0,002 M : 1 cm³).

SO₄Mg 8 μ M; KCl 150 μ M; tampon phosphate de sodium pH 7,4 : 30 μ M; acide L-aspartique 30 μ M.

Courbes A et B : AMP 15 μ M; courbe C : ATP 15 μ M.

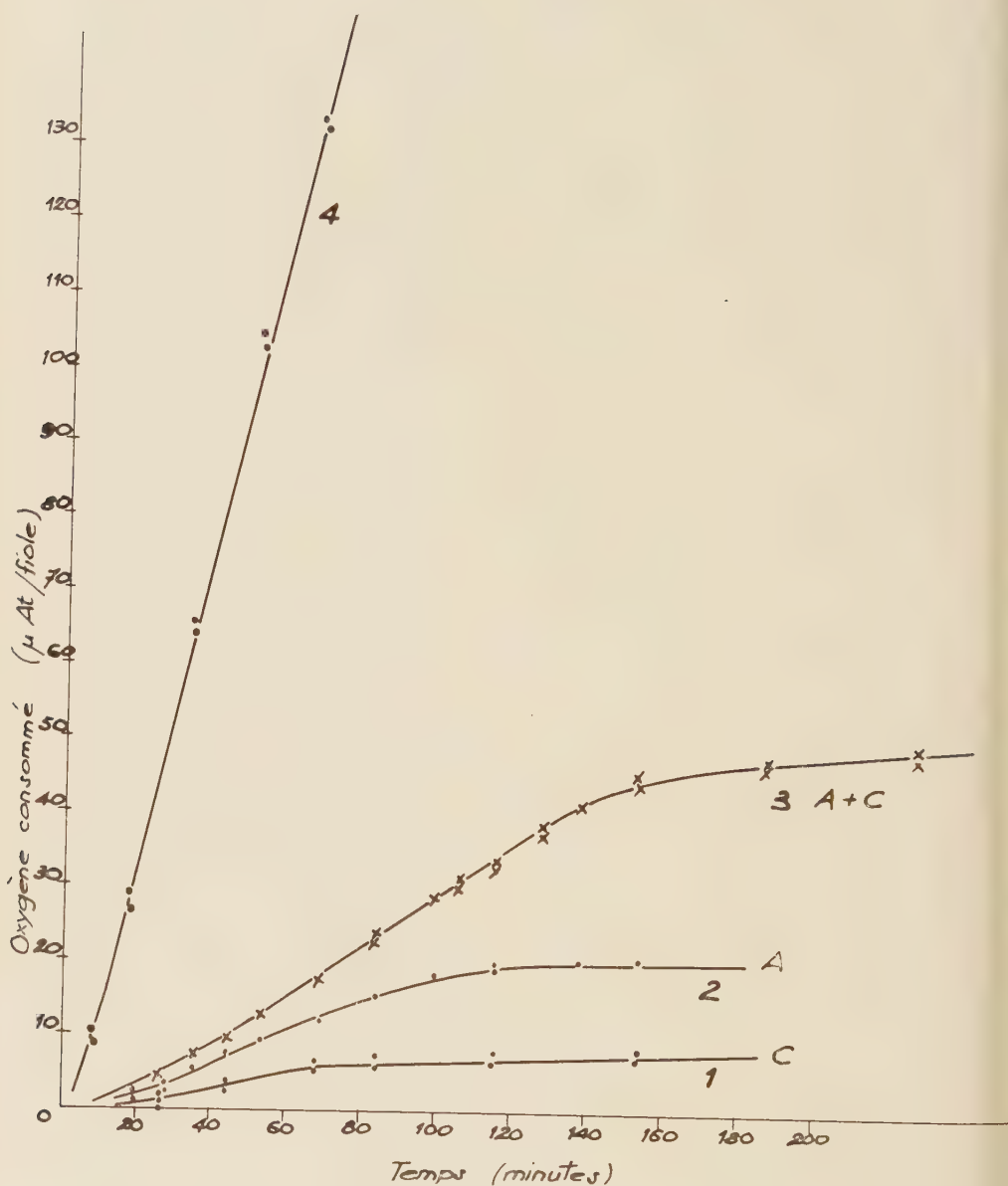


FIG. 31

Influence de la citrulline sur l'oxydation de l'acide aspartique

Composition du milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale; 8 μ M de SO₄Mg; 150 μ M de KCl; 60 μ M de tampon phosphate de sodium pH 7,4; 15 μ M d'ATP (sel de potassium PABST).

Courbes :

1. 60 μ M de citrulline,
2. 30 μ M d'acide L-aspartique,
3. 60 μ M de citrulline + 30 μ M d'acide L-aspartique,
4. 60 μ M de proline.

intermédiaires du cycle de KREBS (α -cétoglutarate, succinate, oxalacétate) (fig. 32).

La prolineoxydase mitochondriale est donc différente de l'oxydase des acides L-aminés isolée par BLANCHARD du rein de rat (16) : dans les conditions où cette préparation oxydait notablement la L-proline, elle laissait intact l'acide glutamique. Au contraire, comme l'indiquait MEISTER pour le métabolisme de nombreux acides aminés (79), la deshydrogénase glutamique semble essentielle à l'oxydation de la L-proline. Mais une autre voie du métabolisme glutamique, la transamination, interfère avec cette oxydation.

La spécificité de la prolineoxydase vis-à-vis des différents substrats examinés ci-dessus va nous permettre de discuter le mécanisme d'action de ce système enzymatique.

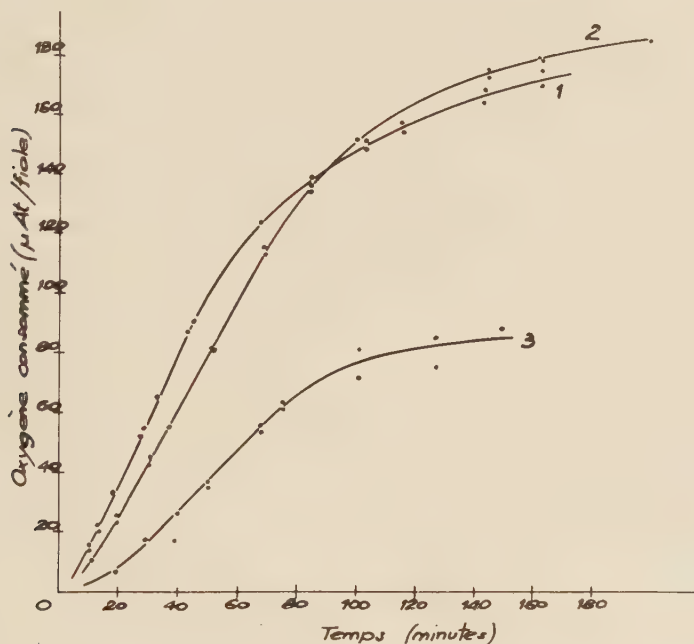


FIG. 32

Oxydation comparée de la proline et des acides α -cétoglutarique et oxalacétique par les mitochondries

Composition du milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale, 8 μ M de SO₄Mg, 150 μ M de KCl, 60 μ M de tampon phosphate de sodium pH 7,4, 15 μ M d'AMP, 30 μ M de substrat.

Courbes :

1. Proline,
2. α -cétoglutarate,
3. Oxalacétate.

CHAPITRE III

MÉCANISME D'OXYDATION DE LA PROLINE
AU NIVEAU DES MITOCHONDRIES

Malgré les données acquises sur le métabolisme de la L-proline chez les mammifères, nous avons été amenés, comme nous l'avons indiqué dans l'introduction à cette deuxième partie, à reprendre l'étude de l'oxydation de cet imino-acide en présence de diverses préparations de foies de rat, en raison du caractère incomplet de cette transformation observé dès nos premières expériences.

En effet, les travaux antérieurs concernaient soit les premiers termes de l'oxydation de la proline, soit sa transformation en ornithine, ou indiquaient pour le processus catabolique global une oxydation complète de la proline. Il convient de rappeler que, dans ce dernier cas, la proline était déterminée par différence entre la totalité des acides aminés (méthode de FOLIN (32) et l'acide glutamique mesuré spécifiquement par la décarboxylase extraite d'*Escherichia coli* ou par la méthode à la chloramine-T. La valeur trouvée pour la proline pouvait donc comprendre également différents acides aminés autres que l'acide glutamique, tandis que la méthode de CHINARD (22) employée dans cette étude était spécifique de la proline ainsi que de l'ornithine et de la citrulline.

Cette détermination du substrat initial était complétée par une analyse chromatographique sur papier des autres acides aminés présents dans le milieu à la fin de la période d'incubation des mitochondries. Cette méthode permettait de détecter les composés présents sans idée préconçue, et de les identifier en diversifiant les conditions de la chromatographie. Nous n'avons ainsi retrouvé d'une manière constante que deux acides aminés, en dehors de la proline restant en plus ou moins grande quantité suivant les conditions expérimentales et de quelques traces d'acides aminés libérés par les mitochondries.

Les milieux d'incubation étaient déprotéinisés soit à l'acide trichloracétique comme il a été précédemment indiqué, et dans ce cas l'extrait destiné à la chromatographie était dessalifié par passage sur colonne de Dowex 50 suivant la technique de BOULANGER (18), soit par addition d'acide chlorhydrique concentré qui était éliminé par plusieurs évaporations successives à sec de l'extrait à chromatographe.

La comparaison de chromatogrammes de milieux d'incubation et de mélanges artificiels d'acides aminés, en une dimension, en utilisant comme solvant de développement :

— soit le phénol aqueux contenant une trace de benzoïnoxime destinée à complexer les impuretés métalliques (35).

(Phénol : 200 cm³, benzoïnoxime : 100 mg, eau : 100 cm³) pendant 24 heures à 25°;

— soit le butanol acétique (95).

(butanol, acide acétique, eau (4, 1, 5) que l'on laisse écouler à la base du papier chromatographique découpé en dents de scie pendant 72 heures, a montré après révélation à la ninhydrine, le même déplacement pour les acides aminés formés pendant l'incubation de la proline et les acides aspartique et glutamique, le premier se distinguant également par la coloration mauve-vert que produit la ninhydrine (planche VI).

L'identité des acides aminés formés a été confirmée :

— par électrophorèse sur la même feuille d'un prélèvement du milieu d'incubation et d'un mélange artificiel, en utilisant comme électrolyte de l'acide acétique N/5, et en appliquant aux extrémités du papier une tension de 400 volts pendant 3 heures. (L'enceinte d'électrophorèse était placée dans une chambre froide à + 5 °C, en vue de réduire la diffusion);

— par chromatographie en deux dimensions (planche VI bis) :

Soit en combinant les deux solvants : phénol cupron-butanol acétique précédemment utilisés indépendamment,

Soit en utilisant un couple un peu différent mis au point par LEVY et CHUNG (72);

— phénol-métacrésol tamponné à pH 8,3 (phénol : 150 g, métacrésol : 300 g, tampon borate pH 8,3 : 75 cm³);

— butanol-acide acétique-eau (250/60/250), provoquant une migration plus faible des acides dicarboxyliques, mais donnant des spots plus nets.

A côté des taches correspondant à ces acides aspartique et glutamique et à la proline apparaissent parfois d'autres taches discrètes que l'on retrouve à la même position et avec la même intensité dans les milieux où les mitochondries ont été incubées en l'absence de proline. Ces acides aminés sont donc de simples produits d'hydrolyse des protéines mitochondriales et nous ne nous y sommes pas arrêtés.

PLANCHE VI

Chromatogramme en une dimension développé par une solution de butanol acétique (95) s'écoulant sur la feuille de papier Whatman n° 1 pendant 72 heures.

T : 25 mm³ de mélange témoin d'acides aspartique et glutamique et de proline;

N° 7 : 10 mm³ d'un extrait concentré de milieu d'incubation de mitochondries pendant 190 mn en présence de 60 micromolécules de L-proline.

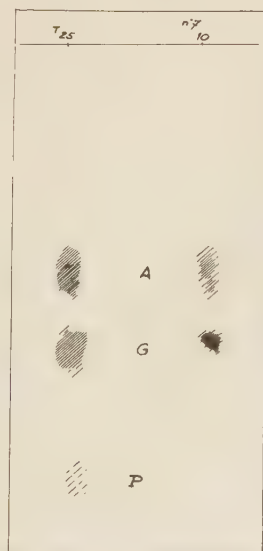
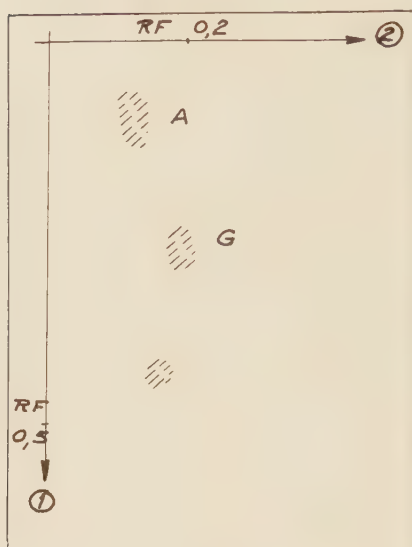
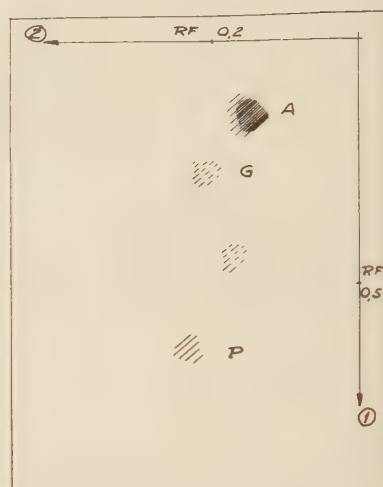


PLANCHE VI bis

IDENTIFICATION DES PRODUITS D'OXYDATION DE LA PROLINE



I



II

Chromatogrammes en deux dimensions développés par les mélanges de solvants :

Direction (1) Phénol-cupron;

Direction (2) Butanol acétique.

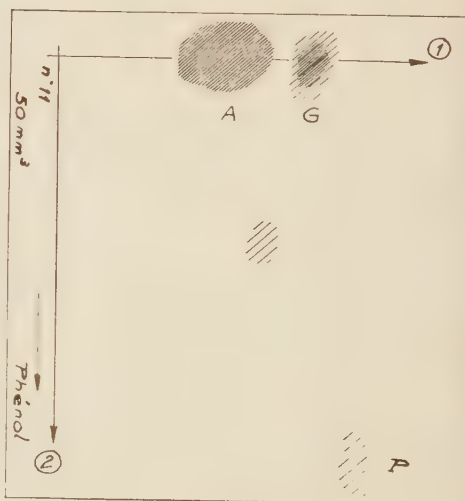
I. Prélèvement d'un milieu d'incubation des mitochondries sans proline;

II. Prélèvement d'un milieu d'incubation des mitochondries avec 60 micromolécules de proline, après 280 minutes.

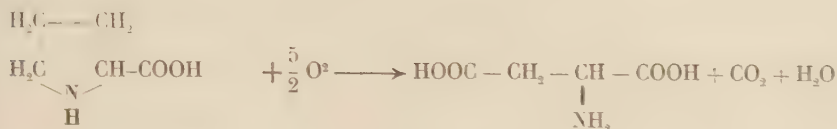
Chromatogramme en deux dimensions de l'extrait II ci-dessus, développé par les mélanges de solvants (72) :

Direction (1) Alcool butylique normal-acide acétique-eau.

Direction (2) Phénol-métacrésol tamponné par un tampon borate de pH 8,3.



On voit sur les chromatogrammes l'importance de l'acide aspartique accumulé dans la transformation de la proline. Globalement, cette transformation peut se formuler ainsi :



Or, la moyenne des valeurs expérimentales de l'oxygène consommé à la proline disparue est de 4,8 (écart quadratique $\sigma = 0,55$) proche de la valeur théorique correspondant à l'équation ci-dessus.

La transformation de la proline en acide aspartique ne s'accompagnerait d'aucune libération d'ammoniaque. Or, nous n'avons pas constaté de différences significatives entre les quantités d'ammoniaque retrouvées après des temps d'incubation variables des mitochondries en présence de proline, ou en l'absence de tout substrat oxydable (tableau 18).

Par quelle voie la proline se transforme-t-elle ainsi en acide aspartique? Ce n'est pas par une simple oxydation, correspondant à la réaction globale ci-dessus.

Nous n'avons certes pas pu isoler l'acide Δ^1 -pyrroline-5-carboxylique dont VOGEL (133) a démontré le rôle d'intermédiaire dans la synthèse de la proline à partir de l'acide glutamique par *E. coli*. Suivant la technique de cet auteur, nous avons cherché à piéger le composé non saturé formé en ajoutant au milieu d'incubation des mitochondries de l'O-aminobenzaldéhyde. Ce composé (préparé selon la méthode de SMITH (119) par réduction d'O-nitrobenzaldéhyde Merck) était introduit sous forme solide (9 mg par fiole de WARBURG contenant 1 cm³ de suspension mitochondriale), car nous n'avons pas trouvé de solvant de l'aldéhyde non toxique pour l'activité des particules. Nous avons obtenu dans ces conditions une inhibition complète de l'oxydation de la proline.

Cependant, la méthode de dosage de STRECKER (124) semble indiquer la présence d'acide Δ^1 -pyrroline-5-carboxylique dans le milieu : elle consiste à faire réagir sur des prélèvements de 2 cm³ du milieu d'incubation :

1 cm³ d'éthanol;

1 cm³ de solution alcoolique à 10 p. 100 d'acide trichloroacétique et à 1 p. 100 d'O-aminobenzaldéhyde,

et à déterminer, après 30 minutes d'incubation à la température ambiante et centrifugation, la densité optique du surnageant à une longueur d'onde de 430 m μ .

La densité optique de prélèvements effectués à différents moments de l'incubation et traités de cette manière présente un maximum après une heure d'incubation des mitochondries en présence de proline, alors que les valeurs obtenues à partir de milieux d'incubation sans proline sont inférieures (fig. 33). Mais nous n'avons pu étalonner la méthode en l'absence de substance témoin (STRECKER utilisait la γ , γ -dicarboxy- γ -acétamidobutyraldéhyde dont nous n'avons pu réaliser la synthèse faute de matériel approprié). Si l'on rapporte la différence des densités optiques, entre l'instant initial et une heure d'incubation à la courbe d'étalonnage de STRECKER, on ne retrouve que 0.2 à 0.3 μ M d'acide pyrroline carboxylique, soit 1 p. 100 de la proline transformée.

TABLEAU N° 18

Dégagement d'ammoniaque au cours de l'oxydation de la proline

Conditions expérimentales : réactions d'oxydation dans l'appareil manométrique de WARBURG à 35 °C en atmosphère d'oxygène.

Milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale (3,80 mg d'azote total);

SO Mg : 8 μ M; KCl 150 μ M; phosphate de sodium pH 7,4 : 30 μ M; AMP 15 μ M; proline 60 μ M.

La réaction est arrêtée par addition d'acide trichloracétique. Après élimination des protéines précipitées, l'ammoniaque est dosée par la méthode de microdiffusion de CONWAY (25) sur 1/25 ou 1/50 du volume d'extrait trichloracétique.

DURÉE D'INCUBATION mn	PROLINE INITIALE μ M	PROLINE OXYDÉE μ M	AMMONIAQUE FORMÉE μ M
0.....	0	—	1
	60	0	3
9.....	0	—	6,5
	60	5	5
	60	3	5
24.....	0	—	9
	60	8	9
	60	10	6
43.....	0	—	9
	60	20	13
	60	19	10
71.....	0	—	12
	60	28	16
	60	30	13
224.....	0	—	29
	60	48	29

Mais d'autres faits montrent d'une manière moins discutable différentes étapes de la réaction d'oxydation de la proline.

C'est en premier lieu la formation, concurremment à l'acide aspartique, d'acide glutamique dont le spot apparaît sur les photographies de chromatogrammes précédentes (planches VI et VI bis). La chromatographie d'extraits prélevés en cours d'incubation montre l'apparition simultanée de ces deux acides dont la concentration augmente au fur et à mesure de l'oxydation de la proline.

C'est ensuite le blocage de la réaction au stade acide glutamique en l'absence de membres du cycle adénylique (planche VII) indiquant que des phosphorylations sont couplées à une étape de l'oxydation ultérieure à l'acide glutamique.

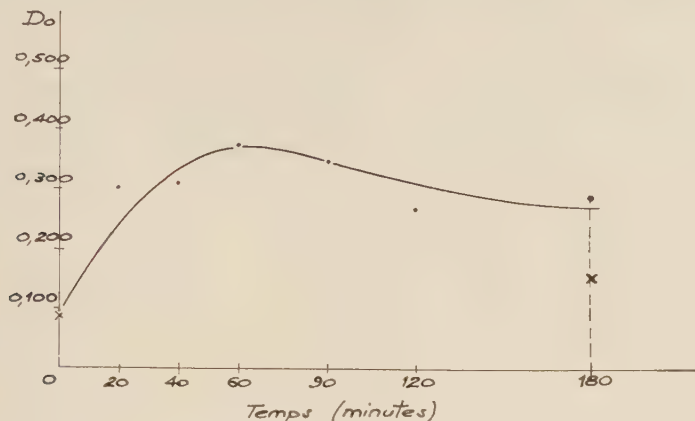


FIG. 33

Variation de la densité optique
après réaction à l'O-aminobenzaldéhyde en fonction du temps d'incubation

- Milieu contenant de la L-proline,
- x Milieu sans proline.

C'est encore l'inhibition partielle de la réaction d'oxydation de la proline par le malonate (fig. 34) montrant nettement le rôle du cycle tricarboxylique dans ce métabolisme. La totalité de la L-proline présente est oxydée, mais le quotient d'oxydation qui dans l'expérience présente était de 6,5, est réduit à 4 en présence de malonate. L'intervention du cycle tricarboxylique dans cette transformation, cycle que le malonate bloque au stade succinate, permet de concevoir l'oxydation de la proline par le schéma suivant :

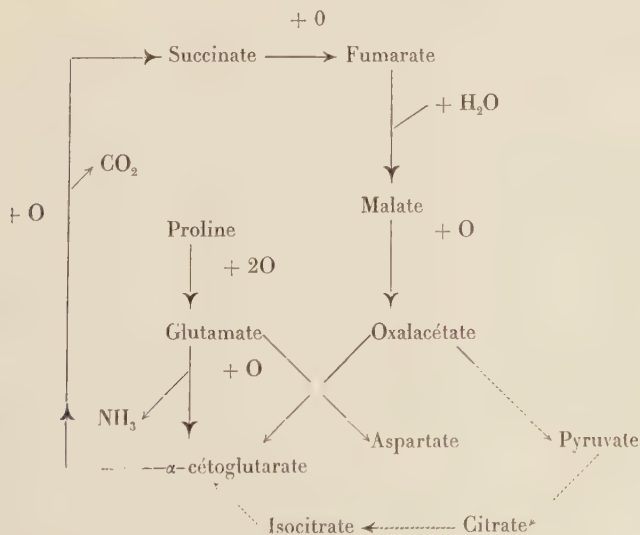
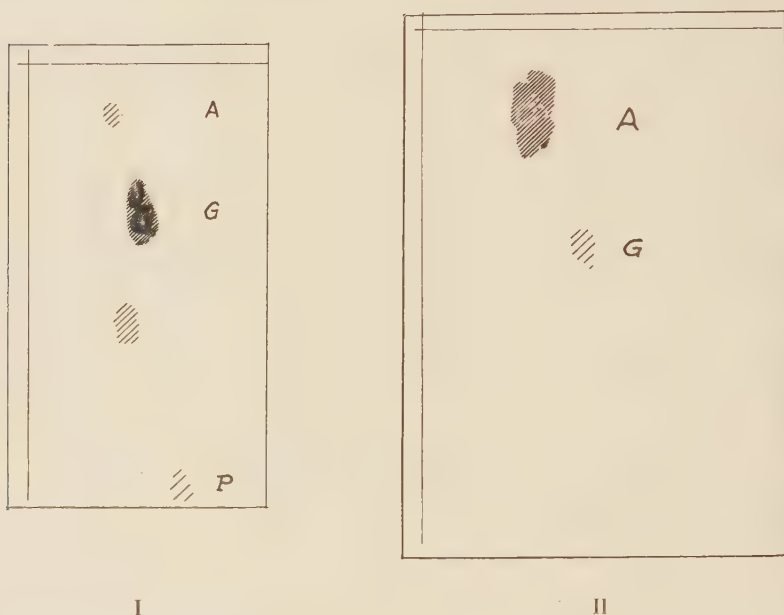


PLANCHE VII

INFLUENCE DE L'ACIDE ADÉNYLIQUE SUR LE MÉTABOLISME DE LA PROLINE



Chromatogrammes développés par les mélanges de solvants :

Direction (1) Phénol-cupron;

Direction (2) Butanol-acétique.

Prélèvement sur un milieu d'incubation des mitochondries en présence de 60 micromolécules de proline après 190 minutes de réaction.

I en l'absence d'acide adénylique (AMP);

II avec 15 micromolécules d'AMP.

A Acide aspartique;

G Acide glutamique

La formation d'acide aspartique s'explique par une transamination entre l'oxalacétate et le glutamate détournant l'oxalacétate de sa voie de transformation normale indiquée en pointillé sur le schéma.

Peut-on attribuer cette déviation à une insuffisance de l'activité de l'oxydase oxalacétique dans notre système? SCHNEIDER (113) avait noté que les mitochondries étaient moins aptes à oxyder l'oxalacétate que la cellule hépatique intacte. Sans pouvoir assurer que nos préparations renferment la totalité de l'activité de l'homogénat brut, nous avons trouvé qu'elles oxydent notablement l'acide oxalacétique, comme le montre la figure 35. La substitution partielle de la transamination à l'oxydation serait due à une accumulation d'acide glutamique plutôt que d'acide oxalacétique : on a d'ailleurs déjà signalé que le quotient d'oxydation $\frac{\text{oxygène}}{\text{proline}}$ diminuait quand s'élevait la concentration initiale en proline, ce qui entraînait une concentration plus forte en acide glutamique.

Cette apparition d'acide aspartique ne peut être attribuée à un artefact au cours de la déprotéinisation du milieu d'incubation ou de la chromatographie, bien que GIRI (36) ait observé des transaminations non enzymatiques au cours des séparations chromatographiques. Mais le fait que, dans certaines circonstances, et en particulier en l'absence d'AMP, on ne retrouve que des traces d'acide aspartique prouve que la réaction de formation se produit bien au cours de l'oxydation. MULLER et LEUTHARDT (83) avaient d'ailleurs noté cette transformation de l'acide glutamique en acide aspartique au niveau des mitochondries de foie, mais trouvaient une inhibition par le malonate supérieure à celle que nous avons pu observer :

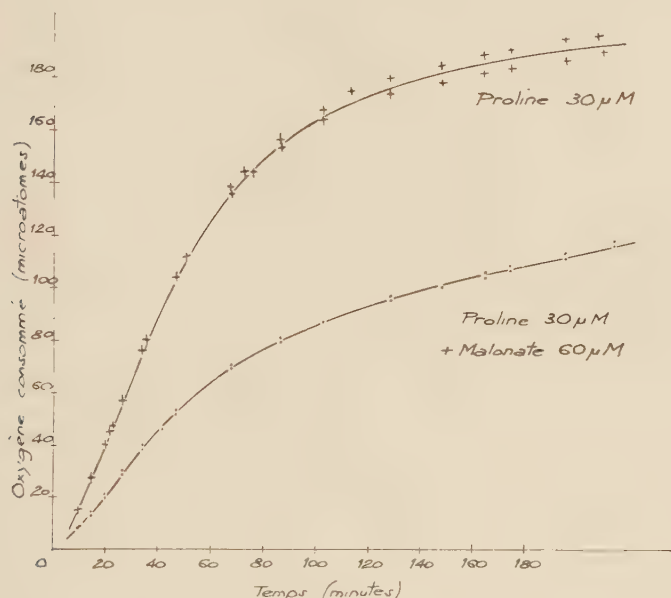


FIG. 34

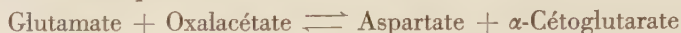
Inhibition de l'oxydation de la proline par le malonate

Composition du milieu et conditions d'incubation habituelles.

elle réduit cependant à 4 le quotient respiratoire, valeur théorique correspondant à l'arrêt de l'oxydation de la proline au stade succinate. L'accumulation de produits intermédiaires comme l'acide glutamique, dont la formation par oxydation de la proline nécessite moins d'oxygène que celle du succinate, montre que cette valeur du rapport $\frac{\text{oxygène}}{\text{proline}}$ n'est qu'une moyenne, et que la réaction se poursuit pour une part au-delà du succinate. L'inhibition de la succinoxydase par le malonate, à la concentration de 60 micromolécules par fiole d'expérience (pour 30 micromolécules de L-proline) est donc partielle, ce qui explique que nous observions encore l'apparition d'acide aspartique à côté de l'acide glutamique sur les chromatogrammes.

Peut-on concevoir que cette transamination soit indépendante de l'oxydation, c'est-à-dire se produise entre l'acide glutamique provenant de la proline et de

l'acide oxalacétique apporté par la suspension mitochondriale? L'absence de respiration endogène de ces particules et de formation d'aspartate lors de l'arrêt de l'oxydation de la proline au stade glutamate, permettent d'écarter cette hypothèse. Au contraire, le fait que la surcharge du milieu en α -cétoglutarate ou en oxalacétate ne fasse pas disparaître l'un ou l'autre des deux acides aminodicarboxyliques par un déplacement de l'équilibre :



dans un sens ou dans l'autre, montre l'importance dans le cas présent des réactions d'oxydation du cycle tricarboxylique, qui transforment rapidement ces deux céto-acides l'un en l'autre avant de les faire disparaître.

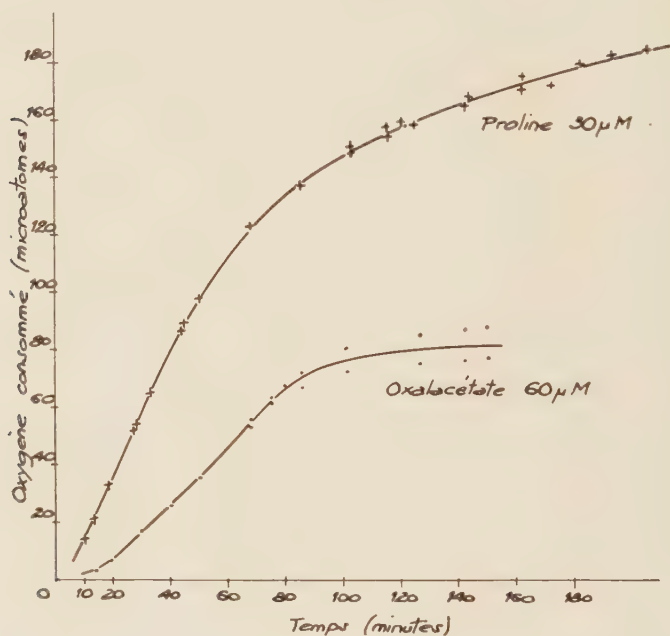


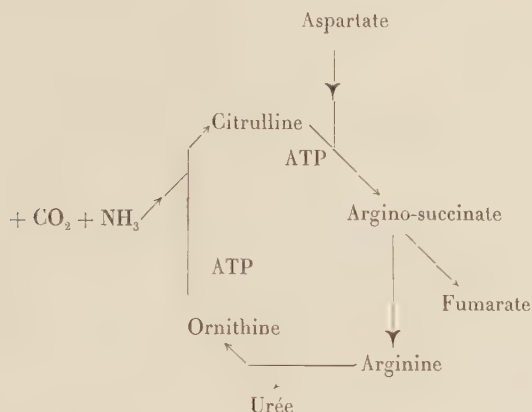
FIG. 35

Oxydation comparée de la L-proline et de l'oxalacétate de sodium
par les mitochondries hépatiques du rat

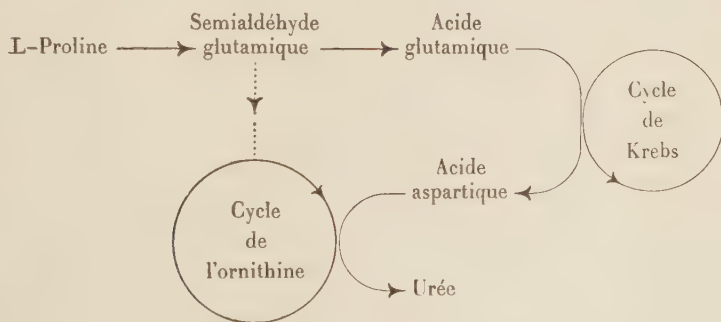
Composition du milieu et conditions d'incubation identiques à celles des expériences précédentes. L'oxalacétate de sodium a été préparé selon la méthode de HEIDELBERGER (45) à partir de diéthyl-oxalacétate de sodium.

Ainsi donc, au niveau des mitochondries, la proline se transforme en acide aspartique, dans une proportion plus ou moins importante suivant la concentration initiale en proline. Mais est-ce là un processus physiologique et a-t-il lieu en particulier dans la cellule intacte? Si l'oxydase oxalacétique est un enzyme à localisation mitochondriale, SCHNEIDER (113) a montré que sa pleine activité était liée à la présence des autres constituants cellulaires et le rapport de la transamination de l'oxalacétate à son oxydation par l'intermédiaire des acides tricarboxyliques peut être moins important à l'échelle de la cellule qu'au niveau des mitochondries.

Mais surtout, en présence de tous les enzymes cytoplasmiques, l'acide aspartique aura la possibilité de se condenser à la citrulline pour former finalement de l'arginine et du fumarate, suivant le cycle :



La L-proline, dont STETTEN et SCHOENHEIMER (122) ont montré le rôle dans le renouvellement des protéines de l'organisme, va ainsi participer à l'élaboration de l'urée à la suite de sa transformation en acide aspartique au niveau des mitochondries hépatiques, ce qui explique l'augmentation de l'uréogénèse observée par PEDERSEN (96) par ingestion de proline. Le cycle des acides tricarboxyliques dont on avait montré l'intervention dans le métabolisme oxydatif de la proline et dont on pensait que, se déroulant intégralement, il permettait l'oxydation complète de cet imino-acide, aurait pour rôle principal de régénérer l'acide oxalacétique nécessaire à la réaction de transamination enzymatique entre les acides glutamique et aspartique. Le cycle de l'ornithine, dans lequel la proline peut d'ailleurs intervenir directement par son oxydation en semialdéhyde γ -glutamique, aurait un rôle annexe analogue dans la transformation de l'acide aspartique en urée. La chaîne de transformations de la L-proline au niveau de la cellule hépatique pourrait donc se formuler de la manière suivante :



CHAPITRE IV

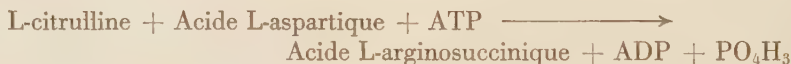
RÔLE ÉNERGÉTIQUE DE L'OXYDATION DE LA PROLINE

Comme nous venons de le voir, l'oxydation de la L-proline au niveau des mitochondries hépatiques conduit à l'accumulation d'acide aspartique que ces particules sont incapables de métaboliser, tout au moins dans les conditions expérimentales correspondant à l'oxydation maximum de la proline. Mais dans la cellule, cet acide aspartique se dégradera par deux voies principales :

— transamination avec l'acide α -céto-glutarique provenant en particulier de l'oxydation des glucides, transamination inverse de celle qui donne ici lieu à son accumulation;

— condensation avec la citrulline formant de l'arginine, réaction endergonique aboutissant à la formation d'urée éliminée par l'organisme.

L'énergie requise par cette dernière transformation sera fournie par l'hydrolyse de liaisons phosphate. D'après RATNER (103) elle correspondrait à l'utilisation d'une molécule d'ATP par molécule d'acide aspartique condensé, selon la réaction initiale :



L'oxydation de la proline va-t-elle être capable de maintenir la concentration en ATP du milieu?

Dans la première partie de cette étude, nous avons vu que nombre des conditions nécessaires à l'oxydation de la L-proline étaient également celles qu'exigeait le couplage des phosphorylations aux oxydations. Effectivement, la réalisation de ces conditions aboutit à une diminution du phosphate minéral du milieu au cours de la réaction enzymatique. Pour nous en assurer nous avons procédé à des séries d'expériences dans lesquelles l'incubation des mitochondries en présence de L-proline était arrêtée au bout d'un temps variable, tout au long duquel la consommation d'oxygène était suivie manométriquement. Cet arrêt de la réaction enzymatique était provoqué par un refroidissement brusque du milieu par trempage de la fiole de WARBURG dans un mélange réfrigérant (acétone-neige carbonique) amenant un début de congélation. Alors seulement était versé dans la fiole 0,5 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 15 p. 100 glacé, pour éviter une hydrolyse acide des esters phosphoriques qui pouvaient s'être formés. Le contenu de la fiole de WARBURG était prélevé dans un tube de centrifugeuse, dans lequel on achevait à 0 °C la déprotéinisation par 1 cm³ supplémentaire d'acide trichloracétique à 15 p. 100. Après quelques heures en chambre froide, centrifugation et lavage du culot de déprotéinisation par de l'acide trichloracétique à 5 p. 100, le phosphate minéral était dosé par la méthode de LOWRY et LOPEZ à l'acide ascorbique et au molybdate d'ammonium (77).

Mais la présence du saccharose provenant de la suspension mitochondriale gênait fortement la réaction colorée, aux concentrations en réactifs indiquées par les auteurs :

0,1 volume d'acide ascorbique à 1 p. 100;
0,1 volume de molybdate d'ammonium à 1 p. 100 dans l'acide sulfurique 0,05 N pour un volume d'extrait.

Le développement de la coloration a été accéléré en augmentant les quantités de réactifs, et le mode opératoire retenu était le suivant :

1 cm³ de solution trichloracétique est amené à un pH compris entre 3 et 4 par 0,15 cm³ d'une solution saturée d'acétate de sodium, et complété par un tampon « acide acétique 0,1 M-acétate de sodium 0,025 M » de pH 4 au volume voulu pour que 1 cm³ de dilution contienne au maximum 5 µg de phosphore sous forme de phosphate minéral;

On pipette successivement dans une cuve de spectrophotomètre Beckman :

— une prise de la dilution dont le volume est amené à 2,3 cm³ par le tampon précédent;

— 0,35 cm³ d'acide ascorbique à 1 p. 100;

— 0,35 cm³ de molybdate d'ammonium à 1 p. 100;

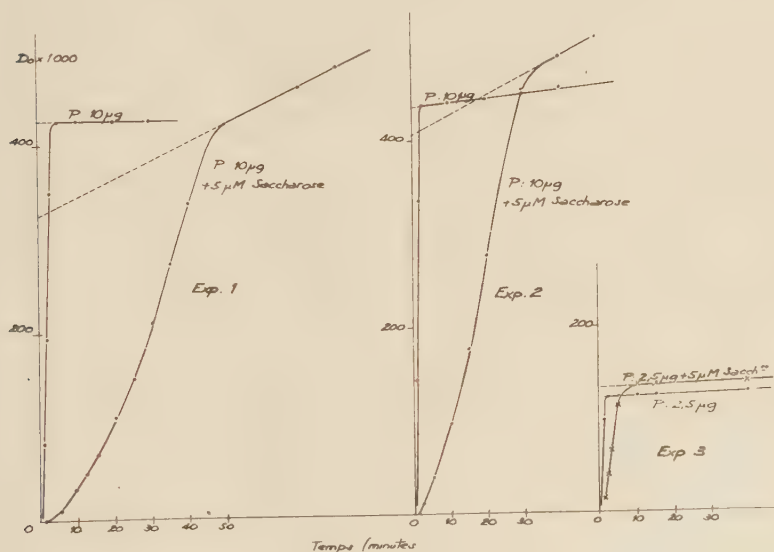


FIG. 36

Influence du saccharose sur la réaction du phosphate et du molybdate d'ammonium

Exp. 1 : 10 µg de phosphore sous forme de phosphate de sodium, seul ou en présence de 5 µM de saccharose. Volume complété à 2,5 cm³ par le tampon « acide acétique 0,1 M-acétate de sodium 0,025 M » de pH 7,4.

Réactifs : 0,25 cm³ d'acide ascorbique à 1 p. 100.

0,25 cm³ de molybdate d'ammonium à 1 p. 100 dans l'acide sulfurique 0,05 N.

Exp. 2 : même quantité de phosphate et de saccharose que dans l'expérience 1 ; mais le volume est complété à 2,3 cm³, et l'on ajoute 0,35 cm³ de chaque réactif.

Exp. 3 : conditions analogues à celles de l'expérience 2, mais la quantité de phosphore est réduite à 2,5 µg.

La variation de la densité optique à 800 m μ est suivie en fonction du temps, jusqu'à obtention d'une valeur constante. La concentration est calculée à partir de la valeur de la densité optique, corrigée de la valeur du blanc correspondant, extrapolée au temps 0 (fig. 36).

Les dosages effectués par cette méthode après extinction de l'activité prolineoxydasique au bout de 4 ou 5 heures d'incubation, n'ont pas montré d'estérification, la quantité de phosphate minéral était sensiblement la même que le milieu ait contenu ou non un substrat oxydable. L'altération des mitochondries libérait même une partie de leur phosphate organique, si bien qu'un milieu d'incubation tamponné par une solution de glycyl-glycine ou de véronal sans phosphate minéral au départ en renfermait jusqu'à 15 micromolécules en fin de réaction.

La présence de fluorure de sodium (90 μ M par fiole) couramment utilisé comme inhibiteur de l'ATPase et des phosphatases, protégeait partiellement de l'hydrolyse les phosphates organiques pendant 3 heures d'incubation, et l'estérification ainsi mise en évidence était plus nette si la réaction était arrêtée après 80 minutes au lieu de se poursuivre jusqu'à extinction (tableau 19).

Mais de toutes façons, le rapport de la phosphorylation à l'oxydation (valeurs de P_i/O portées dans le tableau 19) était faible. Même corrigée de la quantité de phosphate libérée par les mitochondries incubées en l'absence de substrat, la valeur du rapport restait faible (P_i/O corrigées portées dans le tableau). Cette correction repose sur l'hypothèse d'une libération identique de phosphate par les mitochondries en présence ou en l'absence de proline (ce qui est peut-être inexact, la présence du substrat protégeant les mitochondries de la dénaturation de leur assortiment enzymatique, peut éviter partiellement l'hydrolyse des phosphates qui leur sont liés).

L'addition de fluorure de sodium avait d'ailleurs l'inconvénient d'inhiber partiellement la respiration des mitochondries en présence de proline (fig. 37) peut-être par formation d'un complexe fluorophosphate de magnésium auquel WARBURG (138) et NAJJAR (84) ont attribué d'autres inhibitions. Comme elle entraînait en outre une diminution de la stabilité de la préparation, nous avons répété les expériences en l'absence de fluorure, en suivant en fonction du temps au début de la réaction, la disparition du phosphate minéral, corrélativement à sa variation dans un milieu témoin incubé en l'absence de proline. La quantité de phosphate minéral introduit dans le milieu a été réduite à 30 micromolécules pour rendre plus sensible sa disparition. Les résultats de cette expérience sont portés sur la figure 38 : la teneur du milieu en phosphate minéral, en présence de L-proline, passe par un minimum vers la vingtième minute d'incubation, montrant sans équivoque l'existence d'une estérification du phosphate. Au contraire, en l'absence de substrat oxydable il y a élévation continue du niveau du phosphate minéral qui ne peut provenir que de l'AMP ou des mitochondries. La liaison ribose-phosphate de l'acide adénylique est suffisamment stable pour résister aussi bien à l'hydrolyse chimique qu'enzymatique, et c'est dans les mitochondries que doit être recherchée l'origine de la libération de ce phosphate minéral d'autant que le milieu d'incubation, déjà riche en phosphate minéral, va favoriser le gonflement et la rupture des particules.

Si, comme l'indique LEHNINGER (70), l'oxydation du substrat en amenant la formation d'ADP et d'ATP à l'intérieur des particules est capable de protéger partiellement les mitochondries contre cette action destructrice de l'ortho-phosphate, on peut au moins retenir comme mesure de la phosphorylation oxydative

Phosphorylation oxydative en présence du fluorure de sodium

Composition du milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale ; 8 μ M de SO₄Mg ; 150 μ M de KCl ; 60 μ M de tampon phosphate de sodium pH 7,4 ; 15 μ M d'AMP ; 90 μ M de FNa ; Substrat Proline 0 ou 60 μ M.

Volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau distillée.

Potasse à 10 p. 100 dans le puits central 0,2 cm³. Atmosphère Oxygène. Température 35 °C.

SUBSTRAT PROLINE	DURÉE D'INCUBATION min	OXYGÈNE CONSOMMÉ	PROLINE OXALÉE	PHOSPHATE MINÉRAL RESTANT	PHOSPHATE MINÉRAL DISPARU	$\frac{P}{O}$	$\frac{P}{O}$ CORRIGÉ
		μ lit	μ M	μ M	μ M		
μ M							
0	180	6	—	66	— 6		
60	180	158	52	44	+ 16	0,1	0,14
	180	153	52	44	+ 16	0,1	0,14
60	79	110	45	26	34	0,3	0,35
	69	104	48	32	28	0,3	0,34

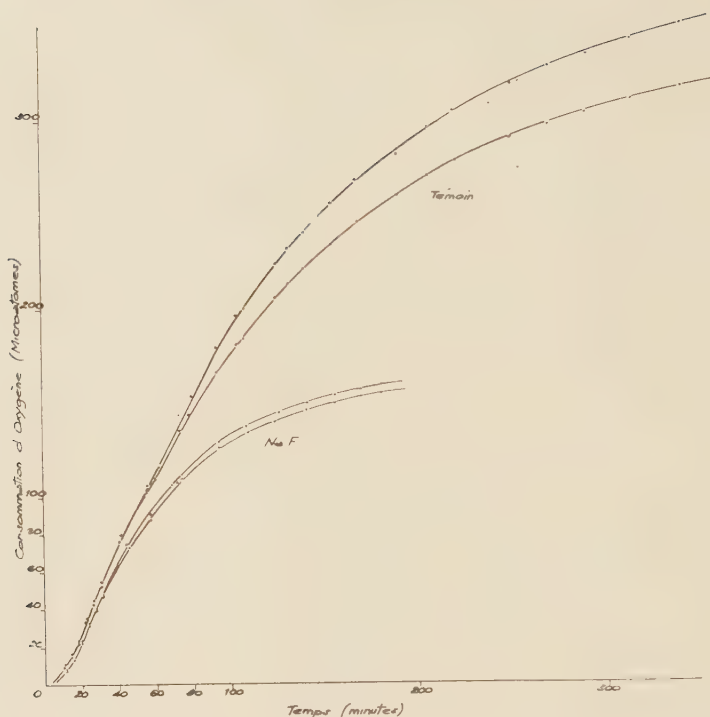


FIG. 37

Inhibition de l'oxydation de la L-proline par les fluorures

Composition du milieu d'incubation : voir tableau précédent.

Courbes : témoin : 60 μ M de L-proline, pas de fluorure de sodium,

NaF : 60 μ M de proline, 90 μ M de fluorure de sodium.

la différence entre le niveau initial de phosphate minéral et le niveau après un certain temps d'incubation.

En raison de la faiblesse relative de cette phosphorylation oxydative, alors que CROSS (27) observait un rapport P/O de 2,1 au cours d'une oxydation d'une vingtaine de minutes de la L-proline par la cyclophorase de rein de lapin, en présence de fluorure de sodium, mais aussi d'hexokinase de levure et de fructose, nous avons repris nos expériences en faisant appel, parallèlement au système adénylique, à un accepteur de phosphate supplémentaire, le système hexokinase-glucose, pouvant transformer l'ATP formé en glucose-6-phosphate beaucoup plus stable.

L'hexokinase utilisée, Hexokinase brute type II offerte par la firme SIGMA, titrait au moment de l'emploi 20 unités BERGER (11) par milligramme. L'hexokinase, dissoute dans une solution de glucose, était placée dans le bras latéral d'une fiole manométrique de WARBURG, et basculée dans le compartiment principal à la fin de la période d'équilibration de température. La composition du milieu, et les conditions opératoires sont détaillées dans la légende de la figure 39, où l'on constate, dès l'introduction du système accepteur, une baisse importante du taux

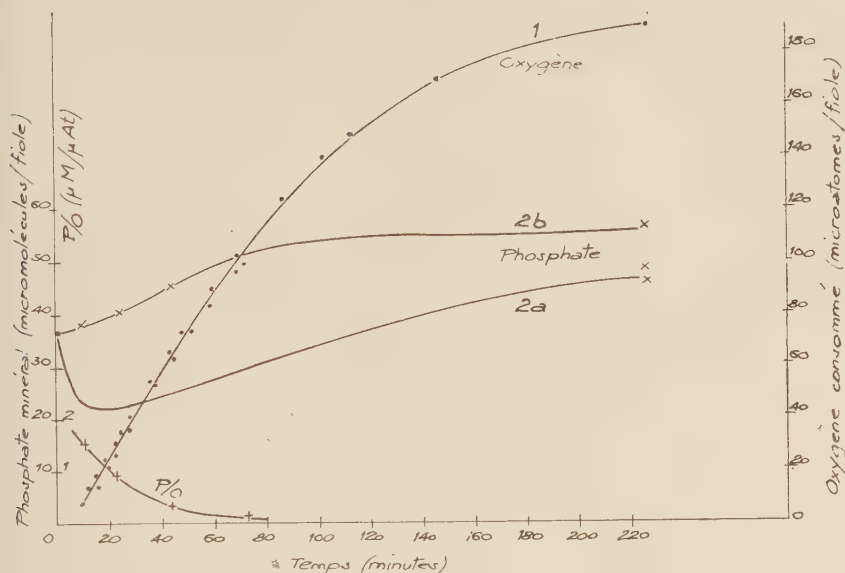


FIG. 38

Phosphorylation oxydative en présence de L-proline

Système accepteur de phosphate : AMP.

Composition du milieu d'incubation :

Suspension mitochondriale 1 cm³ (3,84 mg d'azote total); SO₄Mg : 8 μM; KCl : 150 μM; phosphate de sodium pH 7,4 : 30 μM; AMP : 15,6 μM; proline : 60 μM. Température 37 °C.

Courbe 1 : consommation d'oxygène correspondant à l'oxydation de la proline,

Courbe 2 : quantité de phosphate minéral retrouvée dans les fioles 2a : avec proline - 2b : sans proline,

Courbe 3 : variation du quotient de phosphorylation. Rapport $\frac{P}{O}$ du phosphate estérifié à l'oxygène consommé.

de phosphate minéral du milieu passant par un minimum très accusé environ une heure après l'addition du système piègeur d'ester phosphorique. La température d'incubation a été réduite à 30 °C, ce qui, augmentant la quantité de phosphate estérifié et diminuant la consommation d'oxygène par rapport aux valeurs enregistrées à 37 °C, fournirait un rapport P/O plus élevé. HUNTER (55) avait même indiqué une température optimum de 15 °C pour une valeur maximum du rapport P/O, mais l'activité de la prolineoxydase aurait alors été trop réduite. Si, comme précédemment, nous ne tenons pas compte, dans le calcul du phosphate minéral disparu, de la quantité qui apparaît en l'absence de substrat, mais adoptons comme niveau de référence le taux existant au moment où l'on ajoute au milieu le système hexokinase-glucose (phosphate présent initialement dans le milieu et phosphate détaché des mitochondries par le traitement de déprotéinisation à l'acide trichloracétique au moment du dosage) la mesure de la consommation d'oxygène à partir du même moment permet de suivre l'évolution de la phosphorylation oxydative en fonction du temps [fig. 39], (courbe 4).

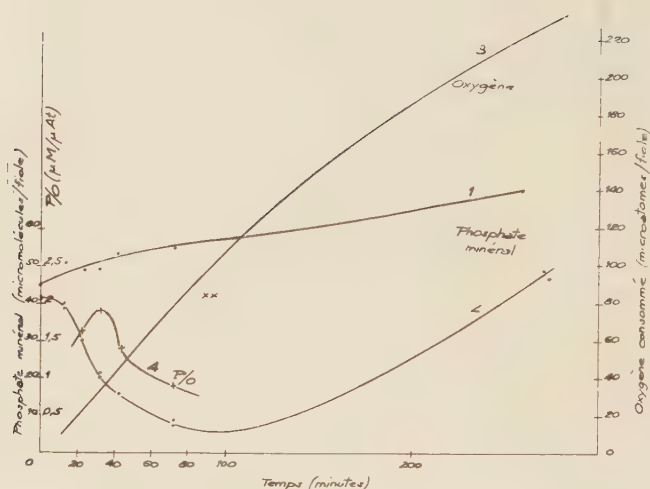


FIG. 39

Phosphorylation accompagnant l'oxydation de la proline en présence d'hexokinase et de glucose

Contenu des fioles d'expérience :

1 cm³ de suspension mitochondriale; 8 μM de SO₄Mg; 150 μM de KCl; 30 μM de phosphate de sodium pH 7,4; 12 μM d'ATP de potassium; 60 μM de proline.

Dans le bras latéral des fioles : 20 mg d'hexokinase dans 0,5 cm³ de glucose 0,1 M. Potasse à 10 % dans le puits central. Atmosphère d'oxygène. Température 30 °C.

Courbe 1 : quantité de phosphate minéral dans les fioles sans proline,

Courbe 2 : quantité de phosphate minéral dans les fioles avec proline.

x : quantité de phosphate minéral en l'absence d'hexokinase.

Courbe 3 : consommation d'oxygène des fioles avec proline, déduction faite de la consommation des blancs.

Courbe 4 : variation du quotient de phosphorylation P/O.

Ces résultats ont été confirmés par une nouvelle expérience réalisée avec un moins grand excès d'hexokinase, et une teneur en phosphate minéral initiale plus élevée à une température supérieure : 35 °C (fig. 40).

Le système hexokinase-glucose permet donc de mettre en évidence une phosphorylation indubitable au cours de l'oxydation de la proline, atteignant sensiblement la valeur 2,4 indiquée par LARDY (68). Du fait de l'activité prolineoxydasique de notre préparation mitochondriale en présence d'AMP ou d'ATP beaucoup plus importante que celle constatée par LARDY dans ses expériences, l'addition du système d'hexokinase-glucose n'a pas entraîné d'activation de la respiration des suspensions : au contraire, aux fortes doses, un certain effet inhibiteur a pu être constaté (fig. 41).

Nous avons précédemment indiqué les difficultés que présentait l'isolement des différentes étapes de la transformation de la proline. Les procédés qui avaient permis à certains auteurs (64) (107) (126) de limiter l'oxydation à ses premiers stades altéraient la prolineoxydase elle-même, et amenaient une réduction importante de la quantité de L-proline transformée par les mitochondries hépatiques. Ils réduisaient aussi considérablement la phosphorylation liée à ces processus oxydatifs, quand ils ne la supprimaient pas totalement. Ces deux phénomènes ne nous semblent

pas indépendants, en raison de la similitude des conditions requises par l'oxydation de la proline elle-même et pour une phosphorylation maximum. S'il n'est pas possible dans ces conditions de préciser la part qui revient aux premiers stades

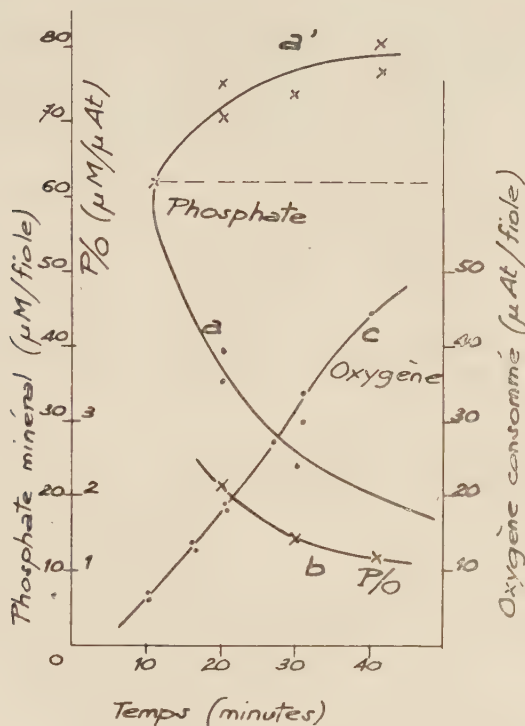


FIG. 40

Phosphorylation oxydative en présence d'ATP, d'hexokinase et de glucose

Composition du milieu :

1 cm^3 de suspension mitochondriale; 8 μM de SO_4Mg ; 150 μM de KCl ; 40 μM de phosphate de sodium pH 7,4; 15 μM d'ATP (sel de potassium PABST); 60 μM de proline pour un volume total de 2,3 cm^3 .

Dans le bras latéral : 5 mg d'hexokinase (100 unités BERGER) et 250 μM de glucose dans 0,5 cm^3 d'eau.

Potasse dans le puits central. Atmosphère oxygène. Température 35 °C.

Courbe a : quantité de phosphate minéral dans les fioles contenant de la proline.

Courbe a' : quantité de phosphate minéral dans les fioles sans substrat.

Courbe b : rapport du phosphate estérifié à l'oxygène consommé.

Courbe c : oxygène consommé.

de la transformation de la proline dans les phosphorylations couplées à l'oxydation globale, celle-ci ne saurait être négligée.

Le fait, précédemment indiqué, qu'en l'absence de l'un des constituants nécessaires aux réactions de phosphorylation oxydative, une part importante de la proline se retrouve sous forme d'acide glutamique [planche VII et (126)] est insuffisant pour conclure que ces phosphorylations se produisent uniquement à un stade

TABLEAU N° 20

Influence des phosphorylations oxydatives dans les premiers stades d'oxydation de la L-proline

EXPÉRIENCE N°	FACTEURS DES PHOSPHORYLATIONS OXYDATIVES				SUBSTRAT INITIAL	CONSOMMATION TOTALE		O ₂ P _{tot}
	PHOSPHATE MINÉRAL		AMP	MgCl ₂		OXYGÈNE	PROLINE	
	μM	μM						
56	30		0	8	Proline 60	25	10	2,5
	30		5,2	8	Proline 60	165	38	4,4
61	30		15,7	0	Proline 60	120	40	3,0
	30		15,7	8	Proline 60	300	58	5,2
62 (tampon véronal)	0		15,7	8	Proline 60	140	35	4
	60		15,7	8	Proline 60	330	59	5,5
67	60		15,7	8	Proline 30	160	30	5,3
	60		15,7	8	Proline 30 + L-Glutamate 30	240	30	

d'oxydation postérieur au glutamate. En effet, dans ces conditions, les mitochondries transforment moins de proline qu'en présence d'AMP ou d'ATP; cette inhibition des premiers stades d'oxydation ne peut être imputée à l'accumulation d'acide glutamique puisque les mitochondries transforment autant de proline en présence d'une quantité équimoléculaire d'acide L-glutamique qu'en son absence (tableau 20). Les phosphorylations oxydatives interviennent donc dès les premiers stades de l'oxydation de la proline, mais l'oxydation de l' α -cétoglutarate intermédiaire formé est certainement responsable de la création de nombreuses liaisons phosphates riches en énergie.

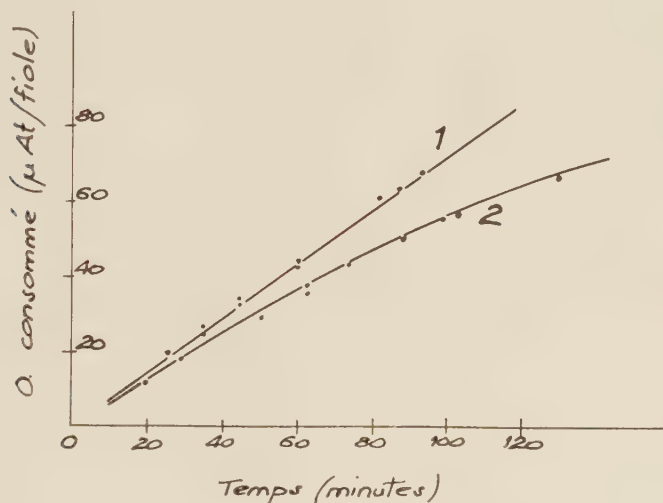


FIG. 41

Influence de l'hexokinase sur l'activité prolineoxydasique

Composition du milieu :

1 cm³ de suspension mitochondriale; 8 µM de SO₄Mg; 150 µM de KCl; 30 µM de tampon phosphate de sodium pH 7,4; 12 µM d'ATP (sel de potassium PABST); 60 µM de proline.

Courbe 1 : volume complété à 2,8 cm³ par de l'eau distillée.

Courbe 2 : 20 mg d'hexokinase brute dans 0,5 cm³ de glucose 0,1 M, versés du bras latéral de la fiole.

Aussi l'oxydation de la proline au niveau des mitochondries, dont nous avons vu qu'elle aboutissait à la formation d'acide aspartique, permet l'accumulation, sous forme d'esters phosphoriques, de l'énergie chimique nécessaire à la transformation de cet acide aminé par condensation avec la citrulline. Mais le couplage avec le cycle de l'ornithine, qui devrait aboutir à la formation d'urée éliminée par la cellule, n'est pas réalisé par les mitochondries hépatiques. La synthèse de l'arginine, par condensation de l'acide L-aspartique et de la L-citrulline, si elle dépend de l'activité des mitochondries, est réalisée par la fraction cellulaire soluble, tant dans le foie que dans le rein (104). Mais l'oxydation de la L-proline par les mitochondries hépatiques fournit tous les éléments nécessaires à cette synthèse.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans toutes nos expériences d'oxydation de la proline par des préparations de foie de rat (homogénats bruts ou lavés, mitochondries) nous avons constaté une oxydation incomplète de la proline, traduisant une déviation du métabolisme considéré comme normal par les auteurs qui s'étaient précédemment intéressés à ce problème (64) (126) : oxydation complète en gaz carbonique, ammoniac et eau par l'intermédiaire de l'acide glutamique et du cycle isocitrique.

Cependant, ni les techniques d'isolement employées, ni les conditions de la réaction ne peuvent être tenues pour responsables de cette déviation. En effet, la rupture assez douce quoique efficace des cellules du tissu hépatique par l'homogénéiseur, mis au point par POTTER, dont nous avons modifié légèrement les conditions d'emploi pour réduire encore les possibilités d'altération de structures subcellulaires, le milieu spécialement étudié pour l'homogénéisation du tissu et pour la séparation par centrifugation différentielle de ses constituants cellulaires (solution isotonique de saccharose 0,25 M et d'éthylène-diamine tétraacétate de sodium 0,002 M) assurent aux préparations obtenues une activité importante. Nous avons précisé le rôle de l'agent complexant, tant dans les centrifugations, où il facilite la séparation et la récupération des mitochondries, que dans la réaction elle-même où il assure aux particules une plus grande stabilité aussi bien morphologique que physiologique. Ayant trouvé une inhibition importante de la prolineoxydase par le calcium, nous pensons comme SLATER (118) que le complexon empêche en particulier la fixation du calcium tissulaire sur les mitochondries.

Dans la cellule hépatique, la prolineoxydase se localise au niveau de ces particules, où l'on retrouve près de 50 p. 100 de l'activité développée par l'homogénat de l'organe avant son fractionnement. Les autres fractions cellulaires, si elles stimulent l'activité mitochondriale et permettent par leur combinaison de récupérer 80 % de l'activité de l'homogénat, sont incapables d'oxyder par elles-mêmes la proline à un degré quelconque, et diminuent fortement la stabilité du système enzymatique.

Les mitochondries ainsi isolées présentent en présence de L-proline un Q_{O_2} de 80 à 90, mais cette activité, plus élevée que celle des préparations antérieures, est soumise à de strictes conditions de milieu. Elle croît avec la concentration en substrat, dont on avait jusqu'ici signalé seulement la nécessité d'un excès, tout au moins jusqu'à un niveau où l'influence sur la structure mitochondriale, par l'intermédiaire de la tonicité du milieu, prédomine sur l'interaction directe enzyme-substrat.

Indépendamment de cet effet structural, l'activité et la concentration en substrat sont liées par les lois classiques de la cinétique enzymatique, déduites de la théorie du complexe enzyme-substrat de Victor HENRI. La vitesse d'utilisation de la proline varie conformément à l'équation de MICHAELIS, avec une valeur de 0,18 micro-molécule par minute et par milligramme d'azote pour la vitesse maximum, et de 0,002 molécule par litre pour la constante K_M .

La présence d'un tampon phosphate est nécessaire, non seulement pour fixer

le pH entre les valeurs limites 7,3 et 7,7, mais aussi pour assurer une concentration minimum en phosphate minéral. Nous avons également défini une valeur optimum de la concentration en magnésium et en composés adényliques. Ces constituants du milieu permettent le couplage à l'oxydation de réactions de phosphorylation que nous avons mises en évidence avec un rapport de phosphorylation P/O un peu supérieur à 2. La supériorité de l'acide adénosine-5-phosphate sur l'ATP et surtout sur l'ADP s'explique par l'influence de la myokinase mitochondriale.

L'énergie liée aux groupes phosphate formés ne paraît pas avoir d'utilisation directe dans la suite des réactions qui se produisent dans l'incubation de la proline avec les mitochondries. Les différentes étapes sont constituées par des réactions d'oxydation exergoniques ou de transamination, et aboutissent à la formation d'acide aspartique qui s'accumule dans le milieu d'incubation, en raison de l'incapacité des mitochondries à le métaboliser. Par l'analyse chromatographique des milieux réactionnels, par l'étude de l'influence d'inhibiteurs spécifiques sur les différentes réactions, nous avons mis en évidence le mécanisme de la transformation de la proline en acide aspartique : l'oxydation de cet imino-acide en acide glutamique est suivie, après un stade d'amorçage empruntant la voie du cycle de KREBS, de sa transamination avec l'acide oxalacétique.

Les mitochondries hépatiques se sont montrées inaptes à condenser, même en présence d'ATP, la citrulline avec l'acide aspartique et à métaboliser ce dernier par l'intermédiaire du fumarate et du cycle de l'ornithine. Par contre, on a signalé que le foie était capable de réaliser cette synthèse, qui s'effectue à grande échelle au niveau du rein.

Si les réactions enzymatiques des systèmes organisés, et des constituants cellulaires en particulier, sont moins artificielles que celles produites par les enzymes isolés, si leur étude peut fournir des indications importantes sur le mécanisme des réactions, les conditions dans lesquelles se produisent de telles réactions sont cependant encore très éloignées de celles réalisées dans la cellule. Comme le suggérait LARDY (66), il conviendrait que les résultats importants obtenus par l'étude du comportement des mitochondries depuis quelques années soient reconsidérés à l'échelle de la cellule intacte et même de l'organe et de l'organisme entier. C'est ainsi, rappelons-le, que l'on a signalé le rôle uréogénétique de la proline par des expériences *in vivo* (96).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ABDERHALDEN E. — Fütterungsversuche mit vollständig abgebauten Nahrungsstoffen; *Z. Physiol. Chem.*, **77**, 22 (1912).
- (2) ACHER R., CHAUVET J., CROCKER C., LAURILA U. R., THAUREAUX J. et FROMAGEOT C. — Isolement et caractérisation des peptides courts obtenus par hydrolyse acide. Étude de la structure du lysozyme et de la vasopressine, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 167 (1954).
- (3) ALBERT A. — Quantitative studies of the avidity of naturally occurring substances for trace metals : I. Amino acids having only two ionizing groups, *Biochem. J.*, **47**, 531 (1950).
- (4) ALMQUIST H. J. et GRAU C. R. — The amino acid requirements of the chick, *J. Nutrition*, **28**, 325 (1944).
- (5) ALTMANN R. — Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen, Leipzig, 1890.
- (6) BAKER J. R. — Cytological technique, *Methuen Ed.*, 1951, 187.
- (7) BALTSCHIEFFSKY H. — Mitochondrial oxidative phosphorylation in a magnesium-free medium, *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 434 (1956).
- (8) BASU K. P. et BASAK M. N. — Metabolism of amino acids in heart and lung tissues. *Indian J. Med. Research*, **24**, 1117 (1937).
- (9) BEHRENS M. — Untersuchungen an isolierten Zell- und Gewebsbestandteilen : 1. Isolierung von Zellkernen des Kalbsherzmuskels; *Z. Physiol. Chem.*, **209**, 59 (1932).
- (10) BENSLEY R. R. et HOERR N. L. — Studies on cell structure by the freezing drying method: VI. The preparation and properties of mitochondria; *Anat. Record*, **60**, 449 (1934).
- (11) BERGER L., SLEIN M. W., COLOWICK S. P. et CORI C. F. — Isolation of hexokinase from bakers' yeast, *J. Gen. Physiol.*, **29**, 379 (1946).
- (12) BERNHEIM F. et BERNHEIM M. L. C. — The oxidation of proline and oxyproline by liver, *J. Biol. Chem.*, **96**, 325 (1932).
- (13) BIRBECK M. S. C. et REID E. — A new medium for the isolation of liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 419 (1956).
- (14) BIRBECK M. S. C. et REID E. — Development of an improved medium for the isolation of liver mitochondria, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 609 (1956).
- (15) BLACK S. et WRIGHT N. G. — Intermediate steps in the biosynthesis of threonine... in « Symposium on Amino Acid Metabolism », *John Hopkins Press.*, 1955, p. 592.
- (16) BLANCHARD M., GREEN D. E., NOCITO V. et RATNER S. — l-amino acid oxidase of animal tissue *J. Biol. Chem.*, **155**, 421 (1944).
- (17) BONNER W. D. — Activation of the succinic dehydrogenase - cytochrome system, *Biochem.*, **J.** **56**, 274 (1954).
- (18) BOULANGER P. et BISERTE G. — Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques : II. Modifications techniques et résultats nouveaux (plasma sanguin), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1430 (1951).
- (19) BUEHLER H. J., SCHANTZ E. J. et LAMANNA C. — The elemental and amino-acid composition of crystalline clostridium botulinum type A toxin, *J. Biol. Chem.*, **169**, 295 (1947).
- (20) CHANCE B. — Physiology of Mitochondria... in « Enzymes : units of Biological structure and Function », *Acad. Press.*, Ed. 1956, p. 259.
- (21) CHAUVEAU J. et CLÉMENT G. — Méthode d'obtention quantitative des structures cellulaires à partir d'un même échantillon de tissu, *Arch. Sci. Physiol.*, **5**, 277 (1951).
- (22) CHINARD F. P. — Photometric estimation of proline and ornithine, *J. Biol. Chem.*, **199**, 91 (1952).
- (23) CHRISTIE G. S. et JUDAH J. D. — Intracellular distribution of enzymes, *Proc. Roy Soc. (Londres)*, **B 141**, 420 (1953).
- (24) CLAUDE A. — Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation : I. Problems, methods and preparation of extract. II. Expérimental procédures and results, *J. Exper. Med.*, **84**, 51 et 61 (1946).
- (25) CONWAY E. S. — Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood Ed., Londres (1950).
- (26) COOPER C., DEVLIN T. M. et LEHNINGER A. L. — Oxidative phosphorylation in an enzyme fraction from mitochondrial extracts; *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 159 (1955).
- (27) CROSS R. J., TAGGART J. V., COVO C. A. et GREEN D. E. — Studies on the cyclophorase system : VI. The coupling of oxidation and phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **177**, 655 (1949).
- (28) DAS N. B. — Studies on amino acid dehydrogenases : I. Proline dehydrogenase. II. Activator of proline dehydrogenase, *Biochem. J.*, **30**, 1080 et 1617 (1936).

- (29) DEWAN J. G. — The l(+) glutamic dehydrogenase of animal tissues, *Biochem. J.* **32**, 1378 (1938).
- (30) DURRUM E. L. — Continuous electrophoresis and ionophoresis on Filter Paper, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4875 (1951).
- (31) FISCHER E. — Über die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure, *Z. Physiol. Chem.*, **33**, 151 (1901).
- (32) FOLIN O. — A new colorimetric method for the determination of the amino-acid nitrogen in blood, *J. Biol. Chem.*, **51**, 377 (1922).
- (33) FONSESSU A. et DAVIES R. E. — The prevention of swelling of Mitochondria, *Biochem. J.*, **61**, VI (1955).
- (34) FRIEDENWALD J. S. et MAENGWYN-DAVIES G. D. — Elementary kinetic theory of enzymatic activity — First order theory... in « Symposium on the Mechanism of Enzyme Action », Mc Elroy et Glass, Ed., 1955, p. 154.
- (35) FROMAGEOT C., PRIVAT DE GARILHE M. — La composition du lysozyme en acides aminés — Acides aminés totaux, *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 509 (1950).
- (36) GIRI K. V. et KALYANKAR G. D. — Non-enzymatic transamination reaction between α -amino acids and keto acids, *Naturwiss.*, **40**, 224 (1953).
- (37) GLIMSTEDT G. et LAGERSTEDT S. — The effect of Versene on the submicroscopical Structure of isolated Rat liver mitochondria, *Kgl. Fysiograf. Sällskap Lund*, Förh. Bd. 23, n° 14, 1 (1953).
- (38) GRAFFLIN A. et GREEN D. E. — Cyclophorase system : II. Complete oxidation of fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **176**, 95 (1948).
- (39) GRASSMANN W. et von ARNIM K. — Über die Reaktion des Nirhydrins und Isatins mit Prolin und Oxyprolin, *Ann. Chem.*, **509**, 288 (1934).
- (40) GREEN D. E. — The cyclophorase — mitochondrial System. 2^e Cong. Intern. Biochim. Sympos. Cycle Tricarbox. Paris 1952, p. 5.
- (41) GREEN D. E. — Organized enzymes systems, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **39**, Suppl. 2, 75 (1952).
- (42) GREEN D. E., LOOMIS W. F. et AUERBACH V. H. — Cyclophorase system : I. Complete oxidation of pyruvic acid to carbon dioxide and water, *J. Biol. Chem.*, **172**, 389 (1948).
- (43) GROSS M. — Effect of Ethylene Diamine Tetraacetic Acid on Adenosine Triphosphatase Activity, *Science*, **118**, 218 (1953).
- (44) HAREL L., JACOB A. et MOULE Y. — Fractionnement des protéines mitochondriales de foie de rat, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 819 (1957).
- (45) HEIDELBERGER C. et HURLBERT R. B. — *Biochem. Prep.*, **3**, 59, John Wiley Ed. 1953.
- (46) HENRI V. — Lois générales de l'action des Diastases, Paris, 1903.
- (47) HESS W. C. et SHAFRAN I. P. — The rates of absorption and of formation of liver glycogen by L-proline and L-hydroxyproline, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 474 (1951).
- (48) HIER S. W., GRAHAM C. E. et KLEIW D. — Inhibitory effect of certain amino acids on growth of young male rats, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Méd.*, **56**, 187 (1944).
- (49) HOGEBOOM G. H. — Cytochemical studies of mammalian tissues : II. The distribution of diphosphopyridine nucleotide. - Cytochrome C. - reductase in rat liver fractions, *J. Biol. Chem.*, **177**, 847 (1949).
- (50) HOGEBOOM G. H. — The isolation and biochemical properties of liver mitochondria... in « Symposium on Fine Structure of Cells », Noordhoff, 1955, p. 3.
- (51) HOGEBOOM G. H., SCHNEIDER W. C. et PALADE G. E. — Cytochemical studies of mammalian tissues : I. Isolation of intact mitochondria from rat liver, *J. Biol. Chem.*, **172**, 619 (1948).
- (52) HOGEBOOM G. H. et SCHNEIDER W. C. — Cytochemical studies of mammalian tissues : III. Isocitric dehydrogenase and Triphosphopyridine nucleotide - cytochrome C - reductase of mouse liver, *J. Biol. Chem.*, **186**, 417 (1950).
- (53) HOGEBOOM G. H., SCHNEIDER W. C. et STRIEBICH M. J. — Cytochemical studies : V. On the isolation and biochemical properties of liver cell nuclei, *J. Biol. Chem.*, **196**, 111 (1952).
- (54) HOGEBOOM G. H. et SCHNEIDER W. C. — Intracellular distribution of enzymes : XI. Glutamic dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **204**, 233 (1953).
- (55) HUNTER F. E. et HIXON W. S. — Phosphorylation coupled with the oxidation of α -keto-glutaric acid, *J. Biol. Chem.*, **181**, 73 (1949).
- (56) KIELLEY W. W. — In a « Symposium on Phosphorus Metabolism », vol. I, Johns Hopkins Press., 1951, p. 517.
- (57) KIELLEY W. W. et KIELLEY R. K. — Myokinase and ATPase in oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **191**, 485 (1951).
- (58) KREBS H. A. — Untersuchungen über den Stoffwechsel der Amino-säuren in Tierkörper, *Z. Physiol. Chem.*, **217**, 191 (1933).

- (59) KREBS H. A. — Oxidation of d (+) proline by d-amino acid oxidase, *Enzymologia*, **7**, 53 (1939).
- (60) KUFF E. L. et HOGEBOOM G. H. — Sedimentation and biochemical characteristics of Cytoplasmic particules... in « Enzymes : Units of biological structure and function », *Academic Press*, 1956, p. 235.
- (61) KULL H. — Eine Modifikation der Altmann'schen Methode zum Färben der chondriosomen, *Anat. Anz.*, **45**, 153 (1914).
- (62) JOHNSON R. B. et ACKERMANN W. W. — A role of nuclei in oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **200**, 263 (1953).
- (63) LANG K. et MAYER V. — Über Bildung und Abbau von L. oxyprolin, *Biochem. Z.*, **324**, 237 (1953).
- (64) LANG K. et SCHMID G. — Über Prolinoxidase, *Biochem. Z.*, **322**, I (1951).
- (65) LARDY H. A. — The biology of phosphorus, *East Lansing*, 1951.
- (66) LARDY H. A. — Symposium on Phosphorus Metabolism, T. I. — *Johns Hopkins Press*, 1951 p. 494.
- (67) LARDY H. A. — Energetic coupling and the regulation of metabolic rates. Conf. Rapp. 3^e Cong. Intern. Bioch. Bruxelles 1955, p. 287.
- (68) LARDY H. A. et WELLMAN H. — Oxidative phosphorylations. — Role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates, *J. Biol. Chem.*, **195**, 215 (1952).
- (69) LEHNINGER A. L. et KENNEDY E. P. — The requirements of the fatty acid oxidase complex of rat liver, *J. Biol. Chem.*, **173**, 753 (1948).
- (70) LEHNINGER A. L. — Physiology of Mitochondria... in « Enzymes : units of Biological Structure and Function », *Acad. Press*, 1956, p. 217.
- (71) LE PAGE G. A. et POTTER V. R. — Effect of trace impurities in Adenosine triphosphate, *J. Biol. Chem.*, **179**, 1229 (1949).
- (72) LEVY A. L. et CHUNG D. — Two-dimensional chromatography of amino-acids on buffered papers, *Anal. Chem.*, **25**, 396 (1953).
- (73) LIEBERMAN M. et BIALE J. B. — Effectiveness of Ethylene Diamine Tetraacetic Acid in the activation of oxidations mediated by mitochondria from Broccoli Buds, *Plant Physiol.*, **30**, 549 (1955).
- (74) LINEWEAVER H. et BURK D. — The determination of Enzyme Dissociation constants, *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
- (75) LOOMIS W. F. — Stabilization of mitochondrial activity by vitrification, *Arch. Biochem.*, **26**, 355 (1950).
- (76) LOW B. W. et EDSALL J. T. — Aspect of protein structure in « Currents in Biochemical Research » *Interscience Pub.*, 1956, p. 378.
- (77) LOWRY D. H. et LOPEZ J. A. — The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters, *J. Biol. Chem.*, **162**, 421 (1946).
- (78) MARTELL A. E. et CALVIN M. — Chemistry of the metal chelate compounds. *PrenticeHall*, Ed. 1952, p. 530.
- (79) MEISTER A. — General reactions of amino acids... in « Symposium on Amino Acid metabolism », *Johns Hopkins Press.*, 1955, p. 3.
- (80) MERKEL J. R. et NICKERSON W. J. — Release of mitochondria from yeast cells by the action of metal chelating agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **39**, 1008 (1953).
- (81) MICHAELIS L. — Diethylbarbiturate buffer, *J. Biol. Chem.*, **87**, 33 (1930).
- (82) MICHAELIS L. et MENTEN M. L. — Die Kinetik der Invertin Wirkung, *Biochem. Z.*, **49**, 33 (1913).
- (83) MULLER A. F. et LEUTHARDT F. — Die Umwandlung der Glutaminsäure und Asparaginsäure in den Mitochondrien der Leber, *Helv. Chem. Acta*, **33**, 268 (1950).
- (84) NAJJAR V. R. — The isolation and properties of phosphoglucomutase, *J. Biol. Chem.*, **175**, 281 (1948).
- (85) NAKADA H. I. et WEINHOUSE S. — Oxidation of aspartic acid by rat liver, *J. Biol. Chem.*, **187**, 663 (1950).
- (86) NEBER M. — Über den Abbau von Prolin in Tierkörper, *Z. Physiol. Chem.*, **240**, 70 (1936).
- (87) NIEMEYER H. et JALIL J. — Increased oxygen uptake of rat liver mitochondria produced by ATPases, *Biochim. Biophys. Acta*, **12**, 492 (1953).
- (88) NOVIKOFF A. B. — Microscopy and differential centrifugation. C. R. 3^e Cong. Intern. Bioch. Bruxelles 1955, p. 315.
- (89) NOVIKOFF A. B., PODBER E., RUAN J. et NOE E. — Biochemical heterogeneity of the cytoplasmic particles isolated from rat-liver homogenate, *J. Hist. Cytoch.*, **1**, 27 (1953).
- (90) NOVIKOFF A. B., BEAUFAY H. et DE DUVE C. — Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver, *J. Biophys. Biochem. Cyt, Suppl.*, **2**, 179 (1956).

- (91) OCHOA S. L. — α -ketoglutaric dehydrogenase of animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **155**, 87 (1944).
- (92) OLSON J. A. et ANFINSEN C. B. — Kinetic and equilibrium studies on crystalline L-glutamic acid dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **202**, 841 (1953).
- (93) PAIGEN K. — The occurrence of several biochemically distinct types of mitochondria in rat liver, *J. Biol. Chem.*, **206**, 945 (1954).
- (94) PALADE G. E. — Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures in « Enzymes : units of Biological Structure and Function », *Acad. Press.*, Ed. 1956, p. 185.
- (95) PARTRIDGE S. M. et WESTALL R. G. — Filter-paper Partition chromatography of Sugars : I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice egg white and foetal blood of sheep, *Biochem. J.*, **42**, 238 (1948).
- (96) PEDERSEN S. et LEWIS H. B. — The partition of urinary N after the oral administration of glutamic acid, pyrrolidone carboxylic acid, proline and hydroxyproline to rabbits, *J. Biol. Chem.*, **154**, 705 (1944).
- (97) POTTER V. R. — The assay of animal tissues for respiratory enzymes : VI. Cell structure in relation to fatty acid oxidation, *J. Biol. Chem.*, **163**, 437 (1946).
- (98) POTTER V. R. et ELVEHJEM C. A. — A modified method for the study of tissues oxidations, *J. Biol. Chem.*, **144**, 495 (1936).
- (99) POTTER V. R. et RECKNAGEL R. O. — The regulation on the rate of oxidation in rat liver mitochondria... in « Symposium of phosphorus metabolism », *Johns Hopkins. Press.*, 1951, Vol. I, p. 377.
- (100) POTTER V. R., RECKNAGEL R. O. et HURLBERT R. B. — Intracellular enzyme distribution interpretation and significance, *Federation Proc.*, **10**, 646 (1951).
- (101) POTTER V. R., SIEKEVITZ P. et SIMONSON H. G. — Latent ATPase activity in resting rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **205**, 893 (1953).
- (102) RAAFLAUB J. — Die Schwellung isolierter Leberzellmitochondrien und ihre physikalisch-chemische Beeinflussbarkeit, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **11**, 142 (1953).
- (103) RATNER S. — Urea synthesis and metabolism of arginine and citrulline, *Advances Enzymol.*, **15**, 319 (1954).
- (104) RATNER S. — Arginine metabolism and interrelationships between the citric acid and urea cycles... in « Symposium on Amino Acid Metabolism », *Johns Hopkins Press*, 1955, p. 231.
- (105) RAVEL J. M., REGER J. L. et SHIWE W. M. — Aspartic acid inhibition of glutamic acid utilisation for proline, citrulline and glutamine synthesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 312 (1955).
- (106) RHODIN J. — Correlation of ultra structural organisation and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney, Stockholm 1954.
- (107) RICAUD P. — Étude de l'oxydation enzymatique de la Proline, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 827 (1954).
- (108) ROCHE J. et RICAUD P. — Localisation intracellulaire de la prolineoxydase hépatique du rat, *Compt. rend. soc. biol.*, **149**, 1364 (1955).
- (109) SACKTOR B. et SANBORN R. — The effect of temperature on oxidative phosphorylation with insect flight muscle mitochondria, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 105 (1956).
- (110) SANGER G. — The structure of Insulin... in « Currents in Biochemical Research », *Interscience Pub.*, 1956, p. 434.
- (111) SCHLENK F. — « Succinic dehydrogenase » in « The Enzymes », vol. II, part. I, p. 33. — *Acad. Press*, Ed. 1950.
- (112) SCHNEIDER W. C. — Intracellular distribution of enzymes : III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fractions, *J. Biol. Chem.*, **176**, 259 (1948).
- (113) SCHNEIDER W. C. et POTTER R. — Intracellular distribution of enzymes : IV. Distribution of oxalacetic oxidase activity in rat liver and rat kidney fractions, *J. Biol. Chem.*, **177**, 893 (1949).
- (114) SHEMIN D. et RITTENBERG D. — On the mechanism of the conversion of ornithine to proline in vivo : intramolecular nitrogen shift, *J. Biol. Chem.*, **158**, 71 (1945).
- (115) SIEKEVITZ P. et WATSON M. L. — Cytochemical studies of mitochondria : II. Enzymes associated with a mitochondrial membrane fraction, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 653 (1956).
- (116) SLATER E. C. — Phosphorylation coupled with reduction of cytochrome C by α -ketoglutarate in heart muscle granules, *Nature*, **166**, 982 (1950).
- (117) SLATER E. C. et CLELAND K. W. — Stabilization of oxidative phosphorylation in heart-muscle sarcosomes, *Nature*, **170**, 118 (1952).
- (118) SLATER E. C. et CLELAND K. W. — The effect of calcium on the respiratory and phosphorylative activities of heart-muscle sarcosomes, *Biochem. J.*, **55**, 566 (1953).
- (119) SMITH L. J. et OPIE J. W. — In Organic Synthesis, *Collective vol. III*, p. 56, *John Wiley*, Ed. 1955.

- (120) SMITH M. E. et GREENBERG D. M. — Preparation and properties of partially purified glutamic semialdehyde reductase, *J. Biol. Chem.*, **226**, 317 (1957).
- (121) SOURKES T. L. et HENEAGE P. — Effect of steroids on oxidation of proline by kidney of adrenalectomized and hypophysectomized rats, *Endocrinology*, **53**, 261 (1953).
- (122) STETTEN M. R. et SCHOENHEIMER R. — The metabolism of L (—) proline studied with the aid of deuterium and isotopic nitrogen, *J. Biol. Chem.*, **153**, 113 (1944).
- (123) STILL J. L., BUELL M. V. et GREEN D. E. — Studies on the cyclophorase system : VIII. Oxidation of L-glutamate, *Arch. Biochem.*, **26**, 406 (1950).
- (124) STRECKER H.-J. — The interconversion of glutamic acid and proline. 1. The formation of Δ -pyrroline-5-carboxylic acid from glutamic acid in *Escherichia Coli*, *J. Biol. Chem.*, **225**, 825 (1957).
- (125) STUMPF P. K. et GREEN D. E. — L-amino acid oxidase of *Proteus Vulgaris*, *J. Biol. Chem.*, **153**, 387 (1944).
- (126) TAGGART J. V. et KRAKAUR R. B. — Studies on the cyclophorase system : V. The oxidation of proline and hydroxyproline, *J. Biol. Chem.*, **177**, 641 (1949).
- (127) TAPLEY D. F., COOPER C. et LEHNINGER A. L. — The action of thyroxine on mitochondria and oxidative phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 597 (1955).
- (128) TRISTRAM G. R. — The amino-acid composition of proteins, in « The Proteins » vol. I, part A, p. 181, *Acad. Press.*, 1953.
- (129) TUPPY H. — The amino-acid sequence in oxytocin, *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 449 (1953).
- (130) UMBREIT W. W., BURRIS R. H. et STRAUFFER J. F. — Manometric technique and related methods, *Burgess Publ. Co.*, Minneapolis (1949), p. 146.
- (131) UMBREIT W. W. et GUNSALUS I. C. — The function of pyridoxine derivatives : arginine and glutamic acid decarboxylases, *J. Biol. Chem.*, **159**, 33 (1945).
- (132) UMBREIT W. W. — Influence of adrenalectomy and cortisone treatment on enzymic reactions in rat tissue, *Am. N. Y. Acad. Sci.*, **54**, 569 (1951).
- (133) VOGEL H. J. et DAVIS B. D. — Glutamic γ -semialdehyde and L-pyrroline-5-carboxylic acid intermediates in the biosynthesis of Proline, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 109 (1952).
- (134) VOGEL H. J. — Metabolism of Glutamic acid, Proline, Ornithine, Citrulline and Arginine... Discussion in « A Symposium on Amino Acid Metabolism », *Johns Hopkins Press*, 1955, p. 352.
- (135) VOGEL H. J. — On the glutamate-proline-ornithine interrelation in various microorganisms in « A Symposium on Amino Acid metabolism », *Johns Hopkins Press*, 1955, p. 335.
- (136) VOGEL H. J. et BONNER D. M. — Glutamate-proline-ornithine interrelation in *Neurospora crassa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **40**, 688 (1954).
- (137) WARBURG O. — Über sauerstoffatmenden Körnchen aus Leberzellen und über Sauerstoffatmung in Berkefeldfiltraten wässriger Leberextrakte, *Arch. ges. Physiol. (Pflüger's)* **154**, 599 (1913).
- (138) WARBURG O. et CHRISTIAN W. — Isolierung und Kristallisation des Garungsferments Enlase, *Biochem. Z.*, **310**, 384 (1942).
- (139) WEIL-MALHERBE H. et KREBS H. A. — Metabolism et Amino-Acids : V. The conversion of proline into glutamic acid in kidney, *Biochem. J.*, **29**, 2077 (1935).
- (140) WILLSTATTER R. — Synthese der Hygrinsäure, *Ber.*, **33**, 1160 (1900).
- (141) WITTER R. F., WATSON M. L. et COTTONE M. A. — Morphology and ATPase of isolated mitochondria, *J. Biophys. Biochem. Cytol*, **1**, 127, (1955).

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	7
PREMIÈRE PARTIE	
LOCALISATION ET CONDITIONS D'ACTIVITÉ OPTIMUM DE LA PROLINEOXYDASE HÉPATIQUE	
CHAPITRE I ^{er} . — Étude préliminaire de l'activité des homogénats lavés de foie de rat.....	10
CHAPITRE II. — Localisation intracellulaire de l'activité prolineoxydasique.....	21
CHAPITRE III. — Facteurs influençant l'activité prolineoxydasique des mitochondries de foie de rat au cours de la séparation des constituants cellulaires.....	33
CHAPITRE IV. — Facteurs de l'oxydation de la L-proline par les mitochondries.....	44
CONCLUSION.....	62
DEUXIÈME PARTIE	
ÉTUDE DE LA RÉACTION D'OXYDATION DE LA L-PROLINE AU NIVEAU DES MITOCHONDRIES HÉPATIQUES	
INTRODUCTION.....	63
CHAPITRE I ^{er} . — Influence de la concentration en substrat sur la vitesse d'oxydation de la L-proline.....	64
CHAPITRE II. — Spécificité enzymatique des mitochondries hépatiques du rat.....	74
CHAPITRE III. — Mécanisme d'oxydation de la proline au niveau des mitochondries.....	86
CHAPITRE IV. — Rôle énergétique de l'oxydation de la proline.....	96
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	106
BIBLIOGRAPHIE.....	108
TABLE DES MATIÈRES.....	113

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

MAGNÉTOCHIMIE DES HÉMOPROTÉINES. APPLICATION DE LA
RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE À L'ÉTUDE
DE LA STRUCTURE DES HÉMOPROTÉINES.

Vu et approuvé :

Paris, le 30 juin 1958

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÈRES

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH

